OECD/OCDE

2018/06/25

試験ガイドライン No.442E

皮膚感作性の有害性発現経路（AOP）でのキーイベントである樹状細胞活性化を用いた *in vitro* 皮膚感作性試験

ご利用に関する注意事項

本文書および本文書に掲載している翻訳は OECD による公式文書**ではありません。**本文書における翻訳と原文の間に用語ないし表現等の齟齬がある場合、**原文のみが有効とみなされます**。内容について疑義が生じた場合、もしくは研究に公的な認証を必要とする場合は、原文に準拠してください。

本翻訳を使用したことに起因する如何なる損害について、当所は一切責任を負いません。

This document and translation are NOT official work by OECD. In the event of any discrepancy between the original work and the translation, **only the text of the original work should be considered valid**. Refer to the original document when there is any doubt about the translation, or legal or official verification is needed for your study. NIHS takes no responsibility even if you get any damage by using this translation.

Reference:

OECD (2026), Test No. 442E: In Vitro Skin Sensitisation: In Vitro Skin Sensitisation assays addressing the Key Event on activation of dendritic cells on the Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, https://doi.org/10.1787/9789264264359-en.

©OECD(2018)

You are free to use this material subject to the terms and conditions available at

http://www.oecd.org/termsandconditions/

経済協力開発機構 （OECD）の化学物質の試験に関するガイドライン Section 4 Health effects
邦訳: 国立医薬品食品衛生研究所(NIHS) 安全性予測評価部

OECD/OCDE **442E**

採択：
2018 年 6 月 25 日

キーイベントに基づく試験のガイドライン

皮膚感作性の有害性発現経路（AOP）でのキーイベントである樹状細胞活性化を用いた *in vitro* 皮膚感作性試験

はじめに

キーイベントである樹状細胞活性化に基づく試験ガイドライン

1.皮膚感作性物質とは、化学品の分類および表示に関する国連勧告世界調和システム（UN GHS）（1）により定義されているとおり、皮膚接触後にアレルギー反応を惹起する物質のことをいう。皮膚感作性の原因となる主要な生物学的事象に関しては、広く意見が一致している。皮膚感作性に伴う化学的、生物学的機序に関する現在の知識は、有害性発現経路（Adverse Outcome Pathway： AOP）（2）の形式で要約され、分子レベルの初期イベントから中間イベントを経て、具体的にはアレルギー性接触皮膚炎である有害作用に至るまでを含む。この場合、分子レベルの初期イベント（1 つ目のキーイベント）は、皮膚蛋白質の求核中心と求電子性物質との共有結合のことである。本 AOP における 2 つ目のキーイベントは角化細胞に起こり、炎症性反応や特異的細胞シグナル伝達経路による遺伝子発現の変化からなる。このようなものに、抗酸化剤／求電子物質応答配列（antioxidant/electrophile response element： ARE）依存性経路がある。3 つ目のキーイベントは樹状細胞（DC）活性化であり、通常は特異的な細胞表面マーカー、ケモカインおよびサイトカインの発現により評価される。4 つ目のキーイベントは、T 細胞活性化と増殖であり、マウス局所リンパ節試験（LLNA）（3）で間接的に測定しうる。

2. この試験ガイドライン（TG）では、皮膚感作性に対する AOP の樹状細胞活性化に関するキーイベントの基礎にある機序を扱う *in vitro* アッセイについて記載する（2）。この TG は、UN GHS（1）に基づく皮膚感作性物質と非感作性物質とを識別するのに用いられる試験方法に関する。

本 TG に記載されている試験方法は次の通り：

- ヒト細胞株活性化試験（h-CLAT）
- U937 細胞株活性化試験（U-SENS™）
- インターロイキン-8 レポーター遺伝子アッセイ（IL-8 Luc アッセイ）

© OECD, (2018)

本資料は、http：//www.oecd.org/termsandconditions/に提示した諸条件に基づき、自由に使用してよい。

化学物質の評価におけるデータの相互受け入れに関する委員会決定付属書 I を修正する権限委譲に対する委員会決定に準拠し［C（2018）49］、本ガイドラインは、2018 年 6 月 25 日に化学委員会と化学物質、殺虫剤およびバイオテクノロジーに関する作業部会との OECD 合同会議で手順書に従って修正された。

3. 本試験ガイドラインにある試験法が、データや測定値を生じるために用いた方法と異なる場合があるが、皮膚感作性での AOP の樹状細胞活性化に対するキーベントの試験結果に関して、各国の要件に対処するのに、区別せずに使用することができ、データの相互受け入れにも役立つ。

キーイベントに基づく試験のガイドラインの試験方法の背景と概要

4. 皮膚感作性の評価には、通常、実験動物が使用されてきた。モルモットを用いる古典的方法である Magnusson and Kligman のモルモットマキシマイゼーション法（GPMT）およびビューラー法（TG 406）（4）は、皮膚感作性の誘導相および誘発相の両者を評価する。マウスを用いる試験である LLNA（TG 429）（3）と、その非放射性修正法 2 種類、具体的には LLNA：DA（TG 442 A）（5）および LLNA：BrdU-ELISA（TG 442 B）（6）はいずれも、誘導相のみを評価するものであり、皮膚感作性の誘導相を客観的に測定するとともに動物福祉という点でモルモット試験より優れていることから、ここに挙げた試験も受け入れられている。

5. 最近、皮膚感作性 AOP の 1 つ目のキーイベント（OECD TG 442C; ペプチド結合性試験（7））および 2 つ目のキーイベント（OECD TG 442D; ARE- Nrf2 ルシフェラーゼ試験（8））を対象とした *in chemico* および *in vitro* の機序に基づく試験法が、化学物質の皮膚感作性の有害性を評価するのに役立つことが認められている。

6. 本 TG に記載した試験方法は、感作性物質に曝露したあとの単球および DC の活性化プロセスによる細胞表面マーカー（CD54、CD86）の発現の変化か、DC 活性化によってもたらされるサイトカインである IL-8 発現の変化のどちらかを定量する。皮膚感作性物質は、DC 活性化と結びついた CD40、CD54、CD80、CD83 および CD86 などの細胞膜マーカーの発現や、IL-1β および TNF-α などの炎症誘発性サイトカイン、IL-8（CXCL8）および CCL3（9）（10）（11）（12）など数種のケモカインを誘導することが報告されている（2）。

7. ただし、DC 活性化は皮膚感作 AOP のひとつのキーイベントのみを示すため（2）（13）、DC 活性化のマーカーを測定する試験法で得た情報のみにより、化学物質の皮膚感作性の有無を結論づけるには十分ではない。このため、この試験ガイドラインに記載されている試験方法で得たデータは、ほかの補足的情報とともに、試験法と評価のための統合的アプローチ（Integrated Approaches to Testing and Assessment：IATA）に用いることにより、皮膚感作性物質（UN GHS カテゴリー1）か非感作性物質かを区別するのに役立つ。IATA とともに用いる情報には、皮膚感作性 AOP の別のキーイベントを扱う *in vitro* アッセイから得たものや、類似化学物質からのリードアクロスをはじめとする試験を伴わない方法などがある（13）。一連の情報源とこれを用いて行われる確立されたデータ解釈作業に関する標準化された方法である Defined Approach で得たデータの使用例が発表されており（13）、IATA の有用な要素として採用することができる。

8. 本試験ガイドラインに記載した試験方法を単独で用いて、皮膚感作性物質を当局が UN GHS（1）で定義したサブカテゴリーである 1A および 1B に分類することはできず、安全性評価に際し、皮膚感作性の強さを予測することもできない。ただし、特定の規制の枠組みによっては、上記方法で得た陽性結果を単独で用いて、化学物質を UN GHS におけるカテゴリー1 に分類できる場合がある。

© OECD 2018

9. 「被験物質」という用語は、本試験法ガイドラインで用いる場合、試験の対象となる物質のことをいい[1]、被験物質が単一成分物質、多成分物質、および／または混合物であるかは本試験法への適用を規定するものではない。多成分物質／混合物の試験に本試験法を適用することに関しては、現時点では情報が限られている（14）（15）。本試験法は、多成分物質および混合物の試験に技術的には適用可能である。混合物、試験困難化合物（不安定など）、本ガイドラインに記載されている適用領域に収まることが明確でない被験物質の試験を検討する場合、そのような試験で科学的に意味のある結果が生じるかどうかを事前に考慮する必要がある。さらに、多成分物質または混合物の試験の場合、認められる反応に細胞毒性成分が影響しうることを考慮する。

文献

1. United Nations UN (2015), Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Sixth revised edition. New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1.

   Available at: [https://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/06files_e.html].

2. OECD (2012), The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Series on Testing and Assessment No. 168. Available at: http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2012)10/PART1&docLanguage=En

3. OECD (2010), The Local Lymph Node Assay. OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 429, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: http://www.oecd.org/env/testguidelines

4. OECD (1992), Skin Sensitisation. OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 406, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: http://www.oecd.org/env/testguidelines

5. OECD (2010), Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay: DA. OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 442A, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: http://www.oecd.org/env/testguidelines

6. OECD (2010), Skin sensitisation: Local Lymph Node Assay: BrdU-ELISA. OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 442B, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: http://www.oecd.org/env/testguidelines

7. OECD (2015), OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 442C: In Chemico Skin Sensitisation: Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA). Paris, France: Organisation for Economic Cooperation and Development. Available at: http://www.oecd.org/env/testguidelines

[1] 2013 年 6 月の合同会議において、可能な場合、新規および更新版の試験法ガイドラインでは、試験の対象となる物質を表現する「被験物質」という用語を一貫して使用するべきであることが合意された。

© OECD 2018

8. OECD (2015), OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 442D: In Vitro Skin Sensitisation: ARE-Nrf2 Luciferase Test Method. Paris, France: Organisation for Economic Cooperation and Development. Available at: http://www.oecd.org/env/testguidelines

9. Steinman RM. 1991. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. Annu Rev Immunol 9:271-96.

10. Caux C, Vanbervliet B, Massacrier C, Azuma M, Okumura K, Lanier LL, and Banchereau J. 1994. B70/B7-2 is identical to CD86 and is the major functional ligand for CD28 expressed on human dendritic cells. J Exp Med 180:1841-7.

11. Aiba S, Terunuma A, Manome H, and Tagami H. 1997. Dendritic cells differently respond to haptens and irritants by their production of cytokines and expression of co-stimulatory molecules. Eur J Immunol 27:3031-8.

12. Aiba S, Manome H, Nakagawa S, Mollah ZU, Mizuashi M, Ohtani T, Yoshino Y, and Tagami. H. 2003. p38 mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinases play distinct roles in the activation of dendritic cells by two representative haptens, NiCl2 and DNCB. J Invest Dermatol 120:390-8.

13. OECD (2016). Series on Testing & Assessment No. 256: Guidance Document On The Reporting Of Defined Approaches And Individual Information Sources To Be Used Within Integrated Approaches To Testing And Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, Annex 1 and Annex 2. ENV/JM/HA(2016)29. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [https://community.oecd.org/community/iatass].

14. Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y, NishiyamaN, Itagaki H. (2010), A comparative evaluation of in vitro skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). Altern. Lab. Anim. 38, 275-284.

15. Piroird, C., Ovigne, J.M., Rousset, F., Martinozzi-Teissier, S., Gomes, C., Cotovio, J., Alépée, N. (2015). The Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS) addresses the activation of dendritic cell event in the adverse outcome pathway for skin sensitization. *Toxicol. In Vitro* 29, 901-916.

© OECD 2018

付属書 I：*In vitro* 皮膚感作性：ヒト細胞株活性化試験（h-CLAT）

最初に考慮すべき事項および限界

1. h-CLAT 法は、ヒト単球性白血病細胞株 THP-1 の単球および樹状細胞（DC）が活性化されて生じる細胞表面マーカー（CD86 および CD54）の発現の変化を定量する（1）（2）。測定された CD86 および CD54 の細胞表面マーカーの発現量を用いて、皮膚感作性物質と非感作性物質との識別に用いられる。

2. h-CLAT 法は、欧州動物実験代替法評価センター（European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing；EURL ECVAM）主導のバリデーション試験とそれに続く EURL ECVAM の科学諮問委員会（Scientific Advisory Committee；ESAC）による独立したピアレビュー（第三者評価）で評価されている。入手可能な証拠と規制当局およびステークホルダーからの情報をすべて考慮し、h-CLAT は、有害性の分類および表示を目的に、感作性物質と非感作性物質とを識別するために IATA の一環として用いることが EURL ECVAM（3）によって推奨されている。h-CLAT データの使用と他の情報との併用に関する例が、文献（4）（5）（6）（7）（8）（9）（10）（11）で報告されている。

3. h-CLAT は、細胞培養技術とフローサイトメトリー分析の経験がある実験室への技術移管が可能であることが確認されている。本試験法に見込まれる予測結果の再現性は、同一施設内および複数の施設間でいずれも約 80%である（3）（12）。バリデーション試験（13）および発表された他の研究（14）から得られたすべての結果によると、LLNA の結果と比較した場合、皮膚感作性物質（UN GHS カテゴリー1）と非感作性物質とを識別する正確度は 85%（N=142）、感度は 93%（94/101）、特異度は 66%（27/41）であった（段落 4 の記載の通り、Log Kow が 3.5 を超える化学物質の陰性結果を含めないすべての既存データでの EURL ECVAM（12）による再解析に基づく）。h-CLAT での偽陰性結果の予測は、皮膚感作性が高い化学物質（UN GHS サブカテゴリー1A）よりも、皮膚感作性が低いか中程度の化学物質（UN GHS サブカテゴリー1B）に認められる可能性が高い（4）（13）（15）。総合すると、上記情報は、h-CLAT が皮膚感作性の有害性を識別するのに有用であることを示している。ただし、h-CLAT 法は、IATA に基づく他の情報を併用し、「はじめに」の段落 7 および 8 の条項に従って検討されるべきであることから、h-CLAT を単独の試験法として算出した正確度の値は指標にすぎない。さらに、動物を用いない皮膚感作性試験法を評価する場合、LLNA 試験もそのほかの動物試験も、ヒトにおける皮膚感作性を完全に反映しているとはいえないことに留意すべきである。

4. 現在入手可能なデータによると、h-CLAT は、有機官能基、反応メカニズム、皮膚感作性の強度（*in vivo* 試験で判定される）、物理化学的特性がさまざまな被験物質に適用可能であることが示されている（3）（14）（15）。h-CLAT は、適切な溶媒／媒体（段落 14 参照）に可溶であるか安定した分散液（被験物質が沈殿することも、溶媒／媒体から分離して異相を示すこともないコロイドまたは懸濁液）となる被験物質に適用可能である。Log Kow が 3.5 を超える被験物質は、偽陰性結果をもたらす傾向がある（14）。そのため、Log Kow が 3.5 を超える被験物質で得られた陰性結果を判断に用いてはならない。ただし、Log Kow が 3.5 を超える被験物質で得られた陽性結果については、被験物質が皮膚感作性物質であるとの判断を裏付けている。さらに、h-CLAT に用いられる細胞株の代謝能が限定的であること（16）や実験条件から、プロハプテン

© OECD 2018

（酵素 P450 を介するなど酵素による活性化を要する物質）および特に酸化速度が遅いプレハプテン（酸化により活性化される物質）も、h-CLAT 陰性結果を示す場合がある（15）。蛍光被験物質は h-CLAT で評価できるが（17）、フルオレセイン・イソチオシアネート（FITC）またはヨウ化プロピジウム（PI）と同じ波長の強い蛍光被験物質は、フローサイトメトリーによる検出を干渉するため、FITC 標識抗体または PI を用いて正確に評価できない。このような場合、補遺 II 収載の習熟度確認物質による FITC 標識抗体（段落 24 参照）または PI（段落 18 参照）と同様の結果をもたらすことが示される場合に限り、他の蛍光色素で標識された抗体、または他の細胞毒性マーカーを用いることができる。上記を踏まえて、陰性結果は、示されている欠点や、IATA の枠組み内の他の情報源に照らして解釈する必要がある。他の特定のカテゴリーに属す被験物質に h-CLAT を適用できない証拠がある場合、h-CLAT をそのようなカテゴリーに属す物質に用いるべきではない。

5. 上記の通り、h-CLAT は、皮膚感作性物質と非感作性物質との識別を後押しすることができる。一方、IATA などの統合的アプローチの中で用いられた場合、感作性の強度の評価が可能な場合もある（4）（5）（9）。とはいえ、h-CLAT の成績が、どのように強度評価に情報を与えるのかを特定するには、ヒトデータに基づいた一層の研究が必要である。

6. 用語の定義を補遺 I に示す。

試験の概要

7. h-CLAT は、被験物質曝露 24 時間後に、ヒト単球性白血病細胞株の THP-1 細胞の細胞表面マーカー発現（CD86 および CD54）の変化を定量する *in vitro* 試験である。ここに挙げた表面分子は、単球系細胞 THP-1 活性化の典型的マーカーで、T 細胞プライミングに重要な役割を担う DC 活性化を再現すると考えられる。蛍光色素で標識された抗体で細胞を染色したあと、表面マーカー発現の変化をフローサイトメトリーで測定する。表面マーカー発現のアップレギュレーションが、細胞毒性に達しない濃度で生じるか評価するため、同時に細胞毒性も測定する。溶媒／媒体対照との比較で表面マーカーの相対蛍光強度を算出し、感作性物質と非感作性物質とを識別するための予測モデル（段落 26 参照）に使用する。

習熟度の立証

8. 試験法ガイドライン 442E の付属書に記載されている試験法を日常的に用いるのに先立ち、実施施設は、補遺 II 収載の習熟度確認用の 10 物質を用いて技術的習熟度を立証する。さらに、本試験法使用者は、反応性のチェック（段落 11 参照）と、陽性対照および溶媒／媒体対照（段落 20～22 参照）により得られたデータの背景データベースを保持し、このようなデータを用いて、実施施設での本試験法の再現性が経時的に維持されていることを確認する。

© OECD 2018

試験手順

9. 本試験法は、EURL ECVAM 主導で行われたバリデーション試験に用いたプロトコルである h-CLAT に関する動物実験代替法データベースサービス（DB-ALM）プロトコル番号 158（18）に基づいている。実施施設において h-CLAT を導入し使用する場合、本プロトコルを用いることが推奨される。*用量設定試験*および *CD86／CD54 発現測定*の 2 段階から成る h-CLAT の主要な構成要素および手順について以下に記す。

細胞の調製

10. h-CLAT の実施には、ヒト単球性白血病細胞株 THP-1 を使用する。使用する細胞（TIB-202™）は、American Type Culture Collection（ATCC）のような十分な適正資格をもつ細胞バンクから入手することが推奨される。

11. THP-1 細胞は室温 37°C、5% CO_2 の加湿雰囲気下で、10%ウシ胎児血清（FBS）、0.05 mM 2-メルカプトエタノール、100 単位/mL ペニシリンおよび 100 µg/mL ストレプトマイシンを添加した RPMI-1640 培地で培養する。培養液にペニシリンとストレプトマイシンを使用しなくてもよい。ただし、使用しない場合、本試験法の利用者は、例えば、補遺 II の習熟度確認物質の試験により、培養液に抗生物質を含まないことが結果に影響を与えないことを検証しなければならない。いずれの場合においても、汚染のリスクを最小限にするために、細胞培養液に抗生物質が存在するか否かに関係なく、優れた細胞培養法を実施すべきである。THP-1 細胞は、2～3 日に一回、定期的に密度 0.1～0.2 × 10^6 cells/mL で播種する。密度 0.1～1.0 × 10^6 cells/mL を維持する。細胞を試験に使用する前に、反応性のチェックを行い、適正であることを判断する。細胞の反応性チェックは、陽性対照である 2,4-ジニトロクロロベンゼン（DNCB）（CAS 番号：97-00-7、純度 99%以上）および硫酸ニッケル（$NiSO_4$）（CAS 番号：10101-97-0、純度 99%以上）と、陰性対照である乳酸（LA）（CAS 番号：50-21-5、純度 85%以上）を用いて、解凍 2 週間後に実施する。DNCB および $NiSO_4$ は、CD86 および CD54 の細胞表面マーカーに陽性反応を示し、LA は CD86 および CD54 の細胞表面マーカーに陰性反応を示さなければならない。反応性チェックで適正と判断された細胞のみを試験で使用する。細胞は、解凍後、最長 2 ヵ月を限度に増殖させることが可能である。継代数は 30 回を超えてはならない。反応性チェックは、段落 20～24 に記載の手順に従って実施する。

12. 試験では、0.1 × 10^6 cells/mL または 0.2 × 10^6 cells/mL の密度で THP-1 細胞を播種し、それぞれ 72 時間または 48 時間、培養フラスコで前培養する。前培養期間直後の培養フラスコの細胞密度を、（上記の前培養 2 条件のうち、どちらかを用いて）各実験で可能な限り同じにすることが重要である。その理由は、前培養期間直後の培養フラスコの細胞密度が、アレルゲンが誘発する CD86／CD54 の発現に影響を及ぼす可能性があるためである（19）。試験当日、培養フラスコから採取した細胞を、2 × 10^6 cells/mL で新たな培養液に再懸濁する。次に、24 ウェル平底プレートに 500 µL（1 × 10^6 cell/well）あるいは 96 ウェル平底プレートに 80 µL（1.6 × 10^5cell/well）の細胞を播種する。

用量設定試験

13. 溶媒／媒体対照と比較して、細胞生存率（CV）が 75%となる被験物質濃度である CV75 を求めるために、*用量設定試験*を実施する。CV75 値は、*CD86／CD54 発現測定*の被験物質曝露濃度を判断する際に用いる（段落 20～24 参照）。

© OECD 2018

被験物質および対照物質の調製

14. 被験物質および対照物質は、試験当日に調製する。h-CLAT の場合、被験物質を、溶媒／媒体の最初の選択として生理食塩水または培地に溶解するか、安定的に分散させる（段落 4 参照）。ここに挙げた 2 種類の溶媒／媒体に被験物質が不溶であるか安定した分散液にならない場合、次の選択としてジメチルスルホキシド（DMSO、純度 99%以上）に溶解、または安定的に分散させる。最終濃度は、100 mg/mL（生理食塩水または培地の場合）または 500 mg/mL（DMSO の場合）にする。十分な科学的根拠を提示できる場合は、上記以外の溶媒／媒体を使用してよい。最終的な溶媒／媒体における被験物質の安定性を考慮する必要がある。

15. 100 mg/mL（生理食塩水または培地の場合）または 500 mg/mL（DMSO の場合）の被験物質の保存原液から、次の希釈段階を実施する：

- 溶媒／媒体が生理食塩水または培地の場合：対応する溶媒／媒体を使用し、2 倍の段階希釈で 8 保存原液（8 濃度）を調製する。次にその保存原液を培養液でさらに 50 倍希釈する（作業用溶液）。1000 µg/mL がプレート中の最終的な最高濃度で、毒性を示さない場合、最大濃度は、新たな細胞毒性試験を実施して求める。生理食塩水または培地で溶解または安定的に分散された被験物質のプレート中の最終濃度は、5000 µg/mL を超えてはならない。
- 溶媒／媒体が DMSO の場合：対応する溶媒／媒体を使用し、2 倍の段階希釈で 8 保存原液（8 濃度）を調製する。この保存原液を培養液でさらに 250 倍希釈する（作業用溶液）。この濃度が毒性を示さない場合であっても、プレート中の最終濃度は、1000 µg/mL を超えてはならない。

最後に、プレートに THP-1 細胞懸濁液と同量の作業用溶液を加えることで（段落 17 参照）、被験物質濃度はさらに 2 倍希釈される（通常、プレートの最終濃度の範囲は 7.81～1000 µg/mL）。

16. h-CLAT に用いる溶媒／媒体対照は、培養液（被験物質が培地または生理食塩水のいずれかに溶解または安定的に分散する場合（段落 4 参照））、または DMSO（被験物質が DMSO に溶解または安定的に分散する場合）であり、プレート中の最終濃度 0.2% 1 種類で試験を行う。これに、段落 15 の作業用溶液の記載と同じ希釈を行う。

被験物質および対照物質の適用

17. 段落 15 および 16 に記載の培養液または作業用溶液を、24 ウェル、または 96 ウェル平底プレート（段落 12 参照）で、調製した細胞懸濁液と 1：1（v/v）で混合する。次に、処理したプレートを 5% CO_2 存在下、37°C で 24±0.5 時間インキュベートする。被験物質とのインキュベーションに先立ち、例えば、プレートをシールすることにより、揮発性の被験物質の蒸発、および被験物質によるウェル間の交差汚染を回避するよう留意する（20）。

ヨウ化プロピジウム（PI）染色

18. 曝露から 24±0.5 時間経過後、細胞をサンプルチューブへ移し、遠心分離により採取する。上清を捨て、残った細胞を 200 µL（96 ウェルの場合）、または 600 µL（24 ウェルの場合）の 0.1% ウシ血清アルブミン含有リン酸緩衝生理食塩水（染色用緩衝液）に再懸濁する。細胞懸濁液 200 µL を 96 ウェル丸底プレート（96 ウェルの場合）に、またはマイクロチューブ（24 ウェルの場合）に移し、200 µL（96 ウェルの場合）、または 600 µL（24 ウェルの場合）の染色用緩衝液で 2 度洗浄する。最後に、細胞を染色用緩衝液（400 µL など）で再懸濁し、PI 溶液（20 µL など）を添

© OECD 2018

加する（この場合、PI の最終濃度は 0.625 µg/mL）。例えば、補遺 II の習熟度確認物質の試験により、別の染色が PI と同様の結果を示す場合、7-アミノアクチノマイシン D（7-AAD）、トリパンブルーなどの他の細胞毒性マーカーを使用することが可能である。

フローサイトメトリーによる細胞毒性測定と CV75 値の算出

19. PI の細胞内への取り込みは、捕捉チャンネル FL-3 でフローサイトメトリーを用いて分析する。合計 1 万個の生細胞（PI 陰性）を観察する。細胞生存率は、サイトメーター解析プログラムにより、以下の式を用いて算出される。細胞生存率が低い場合は、死細胞を含む最大 3 万個の細胞からなるデータが必要である。あるいは、分析開始後 1 分間で得られるデータを取得する。

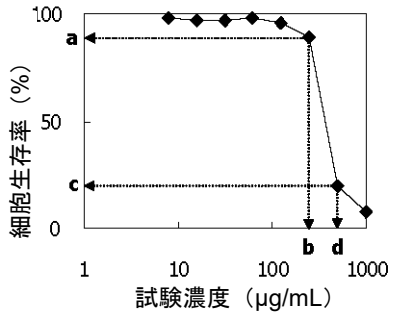
$$\text{細胞生存率} = \frac{\text{生細胞数}}{\text{観察総細胞数}} \times 100$$

CV75 値（段落 13 参照）、すなわち THP-1 細胞の 75%が生細胞である（25%細胞毒性）濃度は、以下の式を用いて対数線形補間により算出する：

$$\text{Log CV75} = \frac{(75 - c) \times \text{Log}(b) - (75 - a) \times \text{Log}(d)}{a - c}$$

ここで：

a は、細胞生存率が 75%以上となる最小の生存率
c は、細胞生存率が 75%未満となる最大の生存率
b および d は、細胞生存率 a および c でのそれぞれの濃度



CV75 値を求める他のアプローチについては、（例えば、習熟度確認物質の試験により）結果に影響を与えないということが証明されれば使用することができる。

© OECD 2018

CD86／CD54 発現測定

被験物質および対照物質の調製

20. 適切な溶媒／媒体（生理食塩水、培地、または DMSO；段落 14 参照）は、被験物質を溶解または安定的に分散するために用いられる。まず、被験物質を*用量設定試験*（段落 19 参照）で求めた 1.2 × CV75 の 100 倍（生理食塩水または培地の場合）、または 500 倍（DMSO の場合）に相当する濃度に希釈する。CV75 を求めることができない場合（すなわち、十分な細胞毒性が*用量設定試験*で認められない場合）、各溶媒／媒体で調製した被験物質の可溶最高濃度、または安定的に分散される最高濃度を開始濃度として用いる。プレート中の最終濃度が、5000 μg/mL（生理食塩水または培地の場合）、または 1000 μg/mL（DMSO の場合）を超えないように留意する。次に、対応する溶媒／媒体を用いて 1.2 倍の段階希釈を行い、h-CLAT（用量調節の例は DB-ALM プロトコル番号 158 を参照）で試験される保存原液（100×1.2 × CV75 から 100×0.335 × CV75（生理食塩水または培地の場合）または 500×1.2 × CV75 から 500×0.335 × CV75 （DMSO の場合）の範囲の 8 濃度）を調製する。次にその保存原液をさらに培養液中で 50 倍（生理食塩水または培地の場合）、または 250 倍（DMSO の場合）に希釈する（作業用溶液）。この作業用溶液は、最終的にはプレート中でさらに 2 倍に希釈され、曝露されることになる。細胞生存率に関して、結果が段落 29 および 30 に記載の許容基準を満たしていない場合は、一層正確な CV75 を求めるために、再度、*用量設定試験*を行う場合がある。24 ウェルプレートだけが、CD86／CD54 発現測定に使用可能であるということに留意する。

21. 溶媒／媒体対照を、段落 16 の記載の通りに調製する。h-CLAT に用いる陽性対照は DNCB（段落 11 参照）とし、DMSO で保存原液を調製する。また、保存原液について段落 20 の記載の通りに希釈する。DNCB は、*CD86／CD54 発現測定*の陽性対照として、プレート中の最終濃度 1 種類（通常 4.0 μg/mL）で使用される。プレートで DNCB 濃度 4.0 μg/mL を得るためには、DMSO を用いて 2 mg/mL の DNCB 保存原液を調製し、さらに 8 μg/mL の作業用溶液にするため、培養液で 250 倍に希釈する。また、各試験施設で求めた DNCB の CV75 も、陽性対照濃度として用いることができる。背景データがあり、ほぼ同じ実施許容基準を満たせば、これ以外の適切な陽性対照を用いることができる。陽性対照は、プレート中の最終濃度が 5000 μg/mL（生理食塩水または培地の場合）、または 1000 μg/mL（DMSO の場合）を超えてはならない。実施許容基準は、被験物質について記載された基準（段落 29 参照）と同一であるが、陽性対照は 1 種類の濃度で試験されるため、最後の許容基準は除外する。

被験物質および対照物質の適用

22. 被験物質および対照物質ごとに、予測結果を求めるのに 1 実験を要する。各実験では、*CD86/CD54 発現測定*を独立して 2 回以上行う（段落 26～28 参照）。独立した各測定は、別の日に実施する。または、a）新たに被験物質の保存原液と作業用溶液、および抗体溶液を独立して調製し、b）独立して採取した細胞を用いる（すなわち、細胞を異なる培養フラスコから採取する）場合は、同日に実施することができる。ただし、細胞は同じ継代数由来でもよい。作業用溶液（500 μL）として調製された被験物質および対照物質を、500 μL の細胞懸濁液（1×10^6 cell）と 1：1 の比率で混合し、細胞を段落 20 および 21 の記載の通り 24±0.5 時間インキュベートする。独立した 2 回以上の実験で予測が得られるため、各実験においては、被験物質と対照物質の各濃度の成績はひとつ（n＝1）で十分である。

© OECD 2018

細胞染色および分析

23. 曝露から 24±0.5 時間経過後、細胞を 24 ウェルプレートからサンプルチューブへ移し、遠心分離により採取する。次に 1 mL の染色用緩衝液で 2 度洗浄する（必要であれば、追加の洗浄を行ってもよい）。洗浄後、細胞を 600 µL のブロッキング溶液（0.01%（w/v）グロブリン（Cohn 分画 II、III ヒト：シグマ社、# G2388-10G）含有染色用緩衝液）で 4°C で 15 分間インキュベートする。ブロッキングのあと、細胞を 96 ウェル丸底プレートまたはマイクロチューブに、180 µL ずつ 3 等分する。

24. 遠心分離後、50 µL の FITC 標識抗 CD86 抗体、抗 CD54 抗体、またはマウス IgG1（アイソタイプ）抗体で、細胞を 4°C で 30 分間染色する。h-CLAT の DB-ALM プロトコル番号 158（18）に記載の抗体を、染色用緩衝液で 3：25（v/v、CD86（BD-PharMingen、#555657；クローン： Fun-1）の場合）または 3：50（v/v、CD54（ダコ社、#F7143；クローン：6.5B5）、および IgG1（ダコ社、#X0927）の場合）に希釈して使用する。ここに挙げた抗体の希釈倍率は、最良のシグナル・ノイズ比を得られるものとして、試験法の開発者から提供された。試験法開発者の経験に基づき、抗体の蛍光強度は、通常、異なるロット間で同じである。ただし、使用者は最適な濃度を決めるために、使用者が自身の試験施設の条件で抗体濃度を漸増減することができる。他の蛍光色素で標識された抗 CD86 および／または抗 CD54 抗体については、例えば、補遺 II 収載の習熟度確認物質の試験により、FITC 標識抗体と同様の結果をもたらすことが示されれば用いることができる。h-CLAT の DB-ALM プロトコル番号 158（18）記載の通り、抗体のクローン、または販売元の変更は、結果に影響する場合があることに留意する。150 µL の染色用緩衝液で 2 回以上洗浄後、細胞を染色用緩衝液（例えば、400 µL）に再懸濁し、PI 溶液（例えば、最終濃度の 0.625 µg/mL を得るには 20 µL）、または別の細胞毒性マーカーの溶液（段落 18 参照）を添加する。CD86 および CD54 の発現量および細胞生存率を、フローサイトメトリーを用いて分析する。

データおよび報告

データの評価

25. CD86 および CD54 の発現量を、捕捉チャンネル FL-1 でフローサイトメトリーを用いて分析する。幾何平均蛍光強度（mean fluorescence intensity：MFI）に基づき、陽性対照（ctrl）細胞と化学物質処理細胞の CD86 および CD54 の相対蛍光強度（relative fluorescence intensity：RFI）を、次の式に従って算出する：

$$\mathbf{RFI} = \frac{\textbf{化学物質処理細胞の MFI} - \textbf{化学物質処理アイソタイプ対照細胞の MFI} \times 100}{\textbf{溶媒／媒体処理対照細胞の MFI} - \textbf{溶媒／媒体処理アイソタイプ対照細胞の MFI}}$$

マウス IgG1（アイソタイプ）抗体で染色したアイソタイプ対照（ctrl）細胞の細胞生存率も、段落 19 記載の式に従って算出する。

予測モデル

26. *CD86／CD54 発現測定*で、1 つの予測（陽性または陰性）結果を得るため、独立した 2 回以上の測定で各被験物質を検討する。2 回の独立した測定の 2 回、または 3 回の独立した測定の 2 回以上に、以下の条件の 1 つ以上を満たす場合に、h-CLAT による予測を陽性とみなし、それ以

© OECD 2018

外の場合を陰性とみなす（図 1）：

- CD86 の RFI が、検討した濃度（細胞生存率が 50%以上）の 1 種類以上で、150%以上であること;
- CD54 の RFI が、検討した濃度（細胞生存率が 50%以上）の 1 種類以上で、200%以上であること。

27.上記に基づき、最初の 2 回の測定が CD86 および／または CD54 のどちらも陽性である場合、h-CLAT による予測を陽性とみなし、3 回目の測定は必要ない。同様に、最初の 2 回の測定が両マーカーのどちらも陰性である場合、h-CLAT による予測を陰性（段落 30 の条項を十分に考慮の上）とみなし、3 回目の測定は不要である。ただし、1 種類以上のマーカー（CD86 または CD54）で最初の 2 回の測定が一致しない場合、3 回目の測定が必要となり、最終予測は結果の多い方（すなわち、3 回中 2 回一致した結果）に基づく。ここで、各 2 回の独立した測定で、1 回が CD86 のみ陽性（以下 P_1 とする）で、もう 1 回が CD54 のみ陽性（以下 P_2 とする）の場合、3 回目が必要となることに留意する。3 回目が両マーカーとも陰性（以下 N とする）である場合、h-CLAT による予測を陰性と判定する。一方、3 回目の測定でどちらかのマーカーが陽性（P_1 または $P_{2)}$ か、CD86 および CD54 とも陽性（以下 P_{12} とする）である場合、h-CLAT による予測を陽性と判定する。

© OECD 2018

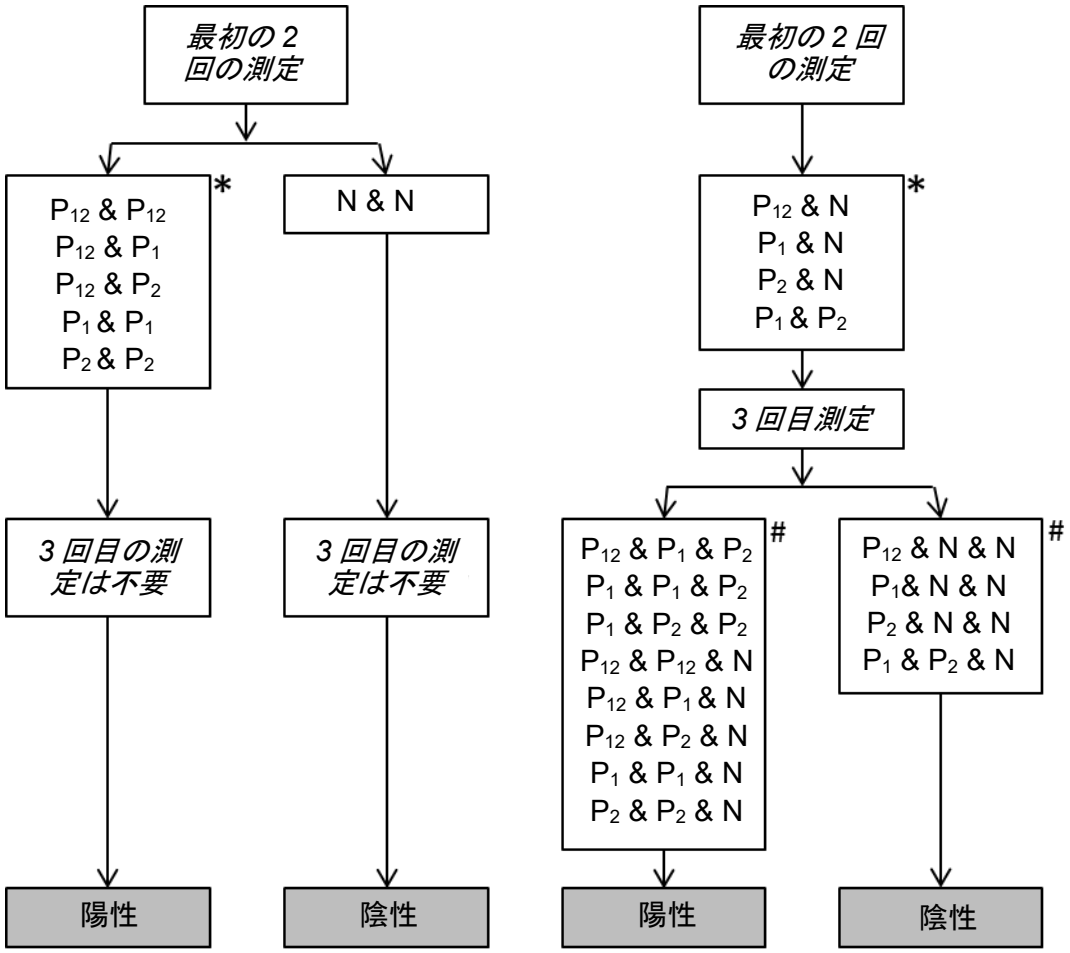


図 1：h-CLAT で用いられる予測モデル.h-CLAT による予測は、IATA の枠組みの中で、また、「はじめに」の段落 7 および 8 の条項に従って検討すること。P_1：測定で CD86 のみ陽性、P_2：測定で CD54 のみ陽性、P_{12}：測定で CD86 および CD54 とも陽性、N：測定で CD86 および CD54 とも陰性。*最初の 2 回の測定から得た結果に関連する組合せを、その得られた順序とは関係なく枠内に示す。#上段の枠で示した最初の 2 回の測定で得られた結果に基づき、3 回目の測定結果に関連する組合せを枠内に示す。ただし、得られた結果の順序は反映していない。

28. h-CLAT で陽性と予測された被験物質の場合、CD86 では EC150、CD54 では EC200 の 2 つの効果濃度（Effective Concentrations：EC）、すなわち被験物質が 150 または 200 の RFI を誘発する濃度が、状況に応じて求まる。このような EC 値が、IATA などの統合的アプローチ（4）（5）（6）（7）（8）の中で用いられた場合、感作性の強度の評価（9）が可能な場合がある。EC 値を次の式により算出できる：

$$\mathbf{EC150（CD86 の場合）} = B_{濃度} + [(150 - B_{RFI}) / (A_{RFI} - B_{RFI}) \times (A_{濃度} - B_{濃度})]$$

ここで

$A_{濃度}$は、RFI が 150 超（CD86 の場合）または 200 超（CD54 の場合）となる最低濃度（μg/mL）

© OECD 2018

$B_{濃度}$は、RFI が 150 未満（CD86 の場合）または 200 未満（CD54 の場合）となる最高濃度（μg/mL）
A_{RFI}は、RFI が 150 超（CD86 の場合）または 200 超（CD54 の場合）となる最低濃度での RFI
B_{RFI}は、RFI が 150 未満（CD86 の場合）または 200 未満（CD54 の場合）となる最高濃度での RFI

EC150 および EC200 の一層正確な値を得るために、独立した 3 回の *CD86／CD54 発現測定*が必要となる場合がある。その場合、EC150 および EC200 の最終的な値は、3 回の独立した測定から算出された EC の中央値として求まる。独立した測定 3 回のうち 2 回のみ陽性基準（段落 26～27 参照）を満たす場合は、EC150 または EC200 に算出された 2 つの値の高い方の値が採用される。

許容基準

29. h-CLAT を用いる場合、次の許容基準を満たすこと（22）（27）。

- 培地対照および溶媒／媒体対照の細胞生存率が 90%より高いこと。
- 溶媒／媒体対照において、CD86 および CD54 の RFI 値が陽性基準（CD86 の場合 150%以上、CD54 の場合 200%以上）を超えないこと。溶媒／媒体対照の RFI 値を、段落 25 記載の式を用いて算出する（溶媒／媒体処理細胞の MFI - 溶媒／媒体処理アイソタイプ対照細胞の MFI × 100／（培地）対照処理対照細胞の MFI - （培地）対照処理アイソタイプ対照細胞の MFI）。
- 培地対照および溶媒／媒体対照のいずれも、CD86 および CD54 のアイソタイプ対照に対する MFI 比が 105%を超えること。
- 陽性対照（DNCB）では、CD86 および CD54 の RFI 値が陽性基準（CD86 の場合 150%以上、CD54 の場合 200%以上）を満たし、細胞生存率が 50%を超えること。
- 被験物質の場合、細胞生存率が各測定の少なくとも 4 つの試験濃度で 50%を超えること。

30. 陰性結果は、最高試験濃度（すなわち、段落 20 記載の段階希釈法に従って 1.2 × CV75）において 90%未満の細胞生存率を示す被験物質のみに当てはまる。1.2 × CV75 での細胞生存率が 90%以上の場合、陰性結果を無効とする。このような場合、再度 CV75 を求め、用量設定をやり直すことが推奨される。生理食塩水（または培地、またはその他の溶媒／媒体）では 5000 μg/mL、DMSO では 1000 μg/mL、または最高可溶濃度を、被験物質の最大試験濃度として用いる場合、細胞生存率が 90%を上回っても陰性結果が許容されることに留意する。

試験報告書

31. 試験報告書には以下の情報を含む。

被験物質

- 単一成分物質
    - 化学的識別情報、例えば IUPAC または CAS 名、CAS 番号、SMILES または InChI コード、構造式および／またはそれ以外の識別に有用な情報;

© OECD 2018

- 外観、Log Kow、水への溶解度、DMSO への溶解度、分子量および入手可能な範囲のその他の関連する物理化学的性質;
- 必要に応じ、また実質的に実行可能な場合の純度、不純物の化学的同定など;
- 該当する場合、試験前の処理（例えば、加温、粉砕）;
- 試験濃度;
- 入手可能な範囲の保存条件および安定性;
- 各被験物質に対する溶媒／媒体選択の妥当性。

- 多成分物質、UVCB 物質および混合物

- 入手可能な範囲の成分の化学的同定（上記参照）、純度、含有量および関連のある物理化学的性質（上記参照）などによるできる限りの成分の特性;
- 外観、水への溶解度、DMSO への溶解度および入手可能な範囲のその他の関連する物理化学的性質;
- 既知組成の混合物／ポリマーの場合、分子量もしくは見かけの分子量、または試験実施に関連するそれ以外の情報;
- 該当する場合、試験前の処理（例えば、加温、粉砕）;
- 試験濃度;
- 入手可能な範囲の保存条件および安定性;
- 各被験物質に対する溶媒／媒体選択の妥当性。

対照物質

- 陽性対照

- 化学的識別情報、例えば IUPAC または CAS 名、CAS 番号、SMILES または InChI コード、構造式および／またはそれ以外の識別に有用な情報;
- 外観、Log Kow、水への溶解度、DMSO への溶解度、分子量および入手可能な範囲で該当する場合、その他の関連する物理化学的性質;
- 必要に応じ、また実質的に実行可能な場合の純度、不純物の化学的同定など;
- 該当する場合、試験前の処理（例えば、加温、粉砕）;
- 試験濃度;
- 入手可能な範囲の保存条件および安定性;
- 該当する場合、適切な実施許容基準であることを示す陽性対照結果の背景データ。

© OECD 2018

- 陰性および溶媒／媒体対照

    - 化学的識別情報、例えばIUPACまたはCAS名、CAS番号、SMILESまたはInChIコード、構造式および／またはそれ以外の識別に有用な情報;
    - 必要に応じ、また実質的に実行可能な場合の純度、不純物の化学的同定など;
    - 本試験法ガイドラインに記載以外の別の対照溶媒／媒体を用いる場合、外観、分子量、および入手可能な範囲のその他の関連する物理化学的性質;
    - 入手可能な範囲の保存条件および安定性;
    - 各被験物質に対する溶媒／媒体選択の妥当性。

試験法の条件

- 試験依頼者名、試験施設名、試験責任者名および住所;
- 試験法の説明;
- 細胞株、その保存条件および供給元（細胞株を入手した施設など）;
- フローサイトメトリー（機種など）、機器の設定内容、グロブリン、抗体、ならびに細胞毒性マーカー;
- 習熟度評価用物質や試験法の検討により、本試験法実施における実施施設の習熟度を示し、経時的な試験法の再現性を立証するのに用いた手順。これには、背景対照データおよび／または反応性確認の背景データなどがある。

試験許容基準

- 許容範囲と比較した、溶媒／媒体対照から得られた細胞生存率、MFIおよびRFIの値;
- 許容範囲と比較した、陽性対照から得られた細胞生存率およびRFIの値;
- 被験物質の全試験濃度における細胞生存率。

試験手順

- 測定実施数;
- 被験物質の濃度、適用、曝露時間（推奨事項と異なる場合）;
- 曝露期間（推奨事項と異なる場合）;
- 評価および測定基準の記述;
- 試験手順の修正があればその記述。

© OECD 2018

結果

- 測定ごとに被験物質および陽性対照について得られた CV75 値（該当する場合）、個々の幾何 MFI 値、RFI 値、細胞生存率、EC150／EC200 値（該当する場合）のデータの一覧表、ならびに予測モデルに従って得られた被験物質の評価の提示;

- 該当する場合、それ以外に関連する知見があればその記述。

結果の考察

- h-CLAT を用いて得られた結果の考察;

- 他の関連情報が入手可能な場合、IATA の範囲内における試験結果の考察。

結論

© OECD 2018

文献

1. Ashikaga T, Yoshida Y, Hirota M, Yoneyama K, Itagaki H, Sakaguchi H, Miyazawa M, Ito Y, Suzuki H, Toyoda H. (2006), Development of an in vitro skin sensitization test using human cell lines: The human Cell Line Activation Test (h-CLAT) I. Optimization of the h-CLAT protocol. Toxicol. In Vitro 20, 767–773.

2. Miyazawa M, Ito Y, Yoshida Y, Sakaguchi H, Suzuki H. (2007), Phenotypic alterations and cytokine production in THP-1 cells in response to allergens. Toxicol. In Vitro 21, 428-437.

3. EC EURL-ECVAM (2013), Recommendation on the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for skin sensitisation testing. Accessible at: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations

4. Takenouchi O, Fukui S, Okamoto K, Kurotani S, Imai N, Fujishiro M, Kyotani D, Kato Y, Kasahara T, Fujita M, Toyoda A, Sekiya D, Watanabe S, Seto H, Hirota M, Ashikaga T, Miyazawa M. (2015), Test battery with the human cell line activation test, direct peptide reactivity assay and DEREK based on a 139 chemical data set for predicting skin sensitizing potential and potency of chemicals. J Appl Toxicol. 35, 1318-1332.

5. Hirota M, Fukui S, Okamoto K, Kurotani S, Imai N, Fujishiro M, Kyotani D, Kato Y, Kasahara T, Fujita M, Toyoda A, Sekiya D, Watanabe S, Seto H, Takenouchi O, Ashikaga T, Miyazawa M. (2015), Evaluation of combinations of in vitro sensitization test descriptors for the artificial neural network-based risk assessment model of skin sensitization. J Appl Toxicol. 35, 1333-1347.

6. Bauch C, Kolle SN, Ramirez T, Fabian E, Mehling A, Teubner W, van Ravenzwaay B, Landsiedel R. (2012), Putting the parts together: combining in vitro methods to test for skin sensitizing potencials. Regul Toxicol Parmacol. 63, 489-504.

7. Van der Veen JW, Rorije E, Emter R, Natch A, van Loveren H, Ezendam J. (2014), Evaluating the performance of integrated approaches for hazard identification of skin sensitizing chemicals. Regul Toxicol Pharmacol. 69, 371-379.

8. Urbisch D, Mehling A, Guth K, Ramirez T, Honarvar N, Kolle S, Landsiedel R, Jaworska J, Kern PS, Gerberick F, Natsch A, Emter R, Ashikaga T, Miyazawa M, Sakaguchi H. (2015), Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. Regul Toxicol Parmacol. 71, 337-351.

9. Jaworska JS, Natsch A, Ryan C, Strickland J, Ashikaga T, Miyazawa M. (2015), Bayesian integrated testing strategy (ITS) for skin sensitization potency assessment: a decision support system for quantitative weight of evidence and adaptive testing strategy. Arch Toxicol. 89, 2355-2383.

10. Strickland J, Zang Q, Kleinstreuer N, Paris M, Lehmann DM, Choksi N, Matheson J, Jacobs A, Lowit A, Allen D, Casey W. (2016), Integrated decision strategies for skin sensitization hazard. J Appl Toxicol. DOI 10.1002/jat.3281.

11. Nukada Y, Ashikaga T, Miyazawa M, Hirota M, Sakaguchi H, Sasa H, Nishiyama N. (2012), Prediction of skin sensitization potency of chemicals by human Cell Line Activation Test (h-CLAT) and an attempt at classifying skin sensitization potency. Toxicol. In Vitro 26, 1150-60.

© OECD 2018

12. EC EURL ECVAM (2015), Re-analysis of the within and between laboratory reproducibility of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT). Accessible at: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations/eurl-ecvam-recommendation-on-the-human-cell-line-activation-test-h-clat-for-skin-sensitisation-testing

13. EC EURL ECVAM (2012), human Cell Line Activation Test (h-CLAT) Validation Study Report Accessible at: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations

14. Takenouchi O, Miyazawa M, Saito K, Ashikaga T, Sakaguchi H. (2013), Predictive performance of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for lipophilic with high octanol-water partition coefficients. J. Toxicol. Sci. 38, 599-609.

15. Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y, NishiyamaN, Itagaki H. (2010), A comparative evaluation of in vitro skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). Altern. Lab. Anim. 38, 275-284.

16. Fabian E., Vogel D., Blatz V., Ramirez T., Kolle S., Eltze T., van Ravenzwaay B., Oesch F., Landsiedel R. (2013), Xenobiotic metabolizin enzyme activities in cells used for testing skin sensitization in vitro. Arch Toxicol 87, 1683-1969.

17. Okamoto K, Kato Y, Kosaka N, Mizuno M, Inaba H, Sono S, Ashikaga T, Nakamura T, Okamoto Y, Sakaguchi H, Kishi M, Kuwahara H, Ohno Y. (2010), The Japanese ring study of a human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting skin sensitization potential (6th report): A study for evaluating oxidative hair dye sensitization potential using h-CLAT. AATEX 15, 81-88.

18. DB-ALM (INVITTOX) (2014), Protocol 158: human Cell Line Activation Test (h-CLAT), 23pp. Accessible at: http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/

19. Mizuno M, Yoshida M, Kodama T, Kosaka N, Okamato K, Sono S, Yamada T, Hasegawa S, Ashikaga T, Kuwahara H, Sakaguchi H, Sato J, Ota N, Okamoto Y, Ohno Y. (2008), Effects of pre-culture conditions on the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) results; Results of the 4th Japanese inter-laboratory study. AATEX 13, 70-82.

20. Sono S, Mizuno M, Kosaka N, Okamoto K, Kato Y, Inaba H, , Nakamura T, Kishi M, Kuwahara H, Sakaguchi H, Okamoto Y, Ashikaga T, Ohno Y. (2010), The Japanese ring study of a human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting skin sensitization potential (7th report): Evaluation of volatile, poorly soluble fragrance materials. AATEX 15, 89-96.

21. OECD (2005), Guidance Document No.34 on "the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment". OECD Series on Testing and Assessment. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, France, 2005, 96 pp.

22. OECD (2012), The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Series on Testing and Assessment No. 168. Available at: http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2012)10/PART1&docLanguage=En

23. United Nations UN (2013), Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Fifth revised edition. New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-

© OECD 2018

117006-1. Available at: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html].

24. ECETOC (2003). Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals (Technical Report No. 87).

25. Ashikaga T, Sakaguchi H, Okamoto K, Mizuno M, Sato J, Yamada T, Yoshida M, Ota N, Hasegawa S, Kodama T, Okamoto Y, Kuwahara H, Kosaka N, Sono S, Ohno Y. (2008), Assessment of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for Skin Sensitization; Results of the First Japanese Inter-laboratory Study. AATEX 13, 27-35.

© OECD 2018

補遺 I

定義

正確度：試験法による結果が、一般的に認められた参照値にどの程度一致するかを示す近似性の指標。試験法の性能の尺度であり、妥当性の一側面である。この用語は、多くの場合、試験法の正確な結果の割合を意味する一致性と同義的に用いられる（21）。

AOP（有害性発現経路）：分子レベルの初期事象から検討対象の *in vivo* 転帰まで、標的化学物質または一群の類似化学物質の化学構造から生じる一連の事象（22）。

CV75：細胞生存率が 75%を示す予測濃度。

EC150：CD86 発現において、RFI 値が 150 を示す濃度。

EC200：CD54 発現において、RFI 値が 200 を示す濃度。

フローサイトメトリー：液体で懸濁された細胞が、細胞およびその構成成分の特徴に応じて散乱する励起光の焦点を通って一度に 1 つずつ流れる細胞測定法。最初に光を吸収し、次に変化した周波数を放出するよう、多くの場合、細胞が蛍光マーカーで標識される。

有害性：生物、生物系、または（その下位に属す）生物集団がある物質に曝露された場合、悪影響を引き起こす可能性がある物質固有の性質または状態のこと。

IATA（試験および評価に関する統合的アプローチ）：ある化学物質または一群の化学物質の危険有害性の同定（可能性）、危険有害性の特徴付け（効力）および／または安全性評価（可能性／効力および曝露）に用いられる体系的アプローチ。本アプローチでは、関連性があるデータをすべて戦略的に統合し重み付けを行うことにより、危険有害性の可能性および／またはリスクおよび／または、さらに的を絞った最小限となる試験の必要性について、規制上の意思決定情報を与える。

培地対照：試験系のすべての構成成分を含む未処理を示す対照。溶媒／媒体と試験系との相互作用の有無を判定するため、このサンプルを被験物質処理サンプルおよびそれ以外の対照サンプルを用いて処理する。

混合物：互いに反応しない 2 つ以上の物質からなる混合物または溶液。

単一成分物質：定量的組成に、1 主要成分が 80%（w/w）以上存在することにより定義される物質。

多成分物質：その定量的組成に、2 つ以上の主要成分が濃度 10%（w/w）以上と 80%（w/w）未満で存在することにより定義される物質。多成分物質は製造過程の結果得られる。混合物と多成分物質との違いは、混合物の場合、2 つ以上の物質が化学反応を起こさず混合することにより得られるのに対し、多成分物質は化学反応の結果得られることにある。

© OECD 2018

陽性対照：試験系のすべての構成成分を含み、陽性反応を誘導することが知られている物質で処理を反復する対照。陽性対照反応の経時的変化を評価できるように、陽性反応の大きさが過剰であってはならない。

プレハプテン：非生物的な変換を通じて感作性物質となる化学物質。

プロハプテン：皮膚感作性を有するために、酵素による活性化を要する化学物質。

相対蛍光強度（RFI）：溶媒／媒体で処理した細胞の MFI との比較によって得られる化学物質で処理した細胞の幾何平均蛍光強度（MFI）の相対値。

妥当性：試験と検討対象の影響との関係と、試験が特定の目的にとって意義や有用性があるかを示す用語。試験が試験対象となる生物学的影響を正確に測定または予測できる程度を示す。妥当性は、試験法の正確性（一致度）を含む（21）。

信頼性：同じプロトコルを用いて試験法を実施したときに得られる経時的な実験室内および実験室間再現性の程度を表す尺度。実験室内および実験室間再現性ならびに実験室内の繰り返し精度の算出により評価される（21）。

測定：溶媒／媒体対照および陽性対照で同時に検討される 1 つ以上の被験物質から成る一組の試験。

感度：すべての陽性化学物質や活性化学物質のうち、試験によって正確に分類されるものの割合。分類的な結果をもたらす試験法の正確性を示す尺度であり、試験法の妥当性を評価する上で考慮することが重要である（21）。

染色用緩衝液：0.1%ウシ血清アルブミン含有リン酸緩衝生理食塩水。

溶媒／媒体対照：用いる溶媒／媒体を含んだ試験系のすべての構成成分を含むが、被験物質は除いてある未処理サンプルのこと。同じ溶媒／媒体に溶解、または安定的に分散した被験物質で処理したサンプルについて、ベースラインの反応を確認するために用いられる。培地対照を同時に用いた試験の場合、本サンプルは、溶媒／媒体と試験系との相互作用の有無も示す。

特異度：すべての陰性や不活性な化学物質のうち、試験によって正確に分類されるものの割合。分類的な結果をもたらす試験法の正確性を示す尺度であり、試験法の妥当性を評価する上で考慮することが重要である（21）。

物質：自然の状態または製造過程で得られる化学元素とその化合物のことをいい、その製品の安定性を保つために必要な添加物や、その使用工程から派生する不純物は含まれるが、その物質の安定性に影響を及ぼすことも、その組成を変化させることもなく分離する可能性のある溶媒は除く。

被験物質：「被験物質」という用語は、試験対象であることをいう場合に用いる。

国連勧告「化学品の分類および表示に関する世界調和システム」（UN GHS）：人々（雇用主、

© OECD 2018

労働者、輸送担当者、消費者、緊急時対応者など）および環境を守るために、危険有害作用に関する情報を伝達することを目的として、物理学上、健康上および環境上の有害性の種類およびレベルの基準に従って化学品（物質および混合物）の分類法を提案するとともに、絵表示・注意喚起語・危険有害性情報・注意書き・化学物質安全性データシートなどの対応する伝達要素を取り扱うシステムである（23）。

UVCB：組成が不明または不定の物質、複雑な反応生成物または生体物質。

妥当な試験法：特定の目的に対し十分な妥当性および信頼性があるとみなされ、科学的に健全な原則に基づいている試験法。ある試験法が絶対的な意味で妥当というのではなく、定義された目的との関連においてのみ妥当であることをいう（21）。

© OECD 2018

補遺 II

習熟度評価用の物質

本試験法ガイドライン 442E の付属書に従って試験法を日常的に用いるのに先立ち、実施施設は、表 1 で推奨される 10 物質について、h-CLAT により期待される予測結果を正確に入手し、習熟度確認 10 物質中 8 物質以上について、それぞれの基準範囲内に含まれる CV75 値、EC150 値および EC200 値を確認することにより技術的習熟度を立証すること。習熟度評価用の物質は、皮膚感作性の有害性について得られる反応の範囲を示すため選択された。それ以外の選択基準は、その物質が市販品であること、高品質の *in vivo* 参照データが入手可能であること、および h-CLAT により得られた高品質の *in vitro* データが入手可能であることに基づく。また、公表されている参照データが h-CLAT で利用可能であることとする（3）（14）。

表 1：h-CLAT の技術的習熟度確認の立証に推奨される物質

習熟度評価用の物質	CAS 番号	物理的状態	*In vivo* における予測 [1]	CV75（μg /mL）の基準範囲 [2]	CD86 の h-CLAT 結果（EC150（μg/mL）の基準範囲）[2]	CD54 の h-CLAT 結果（EC200（μg /mL）の基準範囲）[2]
2,4-ジニトロクロロベンゼン	97-00-7	固体	感作性物質（非常に強い）	2-12	陽性（0.5～10）	陽性（0.5～15）
4-フェニレンジアミン	106-50-3	固体	感作性物質（強い）	5-95	陽性（<40）	陰性（>1.5）[3]
硫酸ニッケル	10101-97-0	固体	感作性物質（中等度）	30-500	陽性（<100）	陽性（10～100）
2-メルカプトベンゾチアゾール	149-30-4	固体	感作性物質（中等度）	30-400	陰性（>10）[3]	陽性（10～140）
R(+)-リモネン	5989-27-5	液体	感作性物質（弱い）	>20	陰性（>5）[3]	陽性（<250）
イミダゾリジニル尿素	39236-46-9	固体	感作性物質（弱い）	25-100	陽性（20～90）	陽性（20～75）
イソプロパノール	67-63-0	液体	非感作性物質	>5000	陰性（>5000）	陰性（>5000）
グリセロール	56-81-5	液体	非感作性物質	>5000	陰性（>5000）	陰性（>5000）
乳酸	50-21-5	液体	非感作性物質	1500-5000	陰性（>5000）	陰性（>5000）
4-アミノ安息香酸	150-13-0	固体	非感作性物質	>1000	陰性（>1000）	陰性（>1000）

略語：CAS 番号 = CAS 登録番号

1 *In vivo* における有害性および（強度の）予測結果は、LLNA データ（3）（14）に基づく。*In vivo* における強度は、ECETOC（24）により提唱された基準を用いている。

2 既存の測定値（13）（25）に基づく。

3 既存の陰性結果の大部分は本マーカーで得られた。従って陰性結果が主に予測される。記載の範囲は、認められた数少ない既存の陽性結果に基づき定義された。陽性結果が得られた場合、EC 値は報告された基準範囲内でなければならない。

© OECD 2018

付属書 II：*In vitro* 皮膚感作性：U937 細胞株活性化試験（U-SENS™）

最初に考慮すべき事項および限界

1. U-SENS™は、単球および樹状細胞（DC）が活性化されて生じる細胞表面マーカー（CD86）のヒト組織球性リンパ腫細胞株 U937 における発現について、感作性物質に対する曝露による変化を定量することができる（1）。これにより、U937 細胞株の細胞表面マーカーである CD86 の発現レベル測定値を用いて、皮膚感作性物質かそうでないかの識別を後押しする。

2. U-SENS™は、L'Oreal 社が主導したバリデーション試験（2）で評価され、その後、欧州動物実験代替法評価センター（EURL ECVAM）科学諮問委員会（ESAC）による独立したピアレビューで評価された（3）。入手可能な証拠と規制当局およびステークホルダーからの情報をすべて考慮し、U-SENS™は、有害性の分類および表示を目的に、感作性物質と非感作性物質を識別するために IATA の一環として用いることが EURL ECVAM （4）によって推奨されている。皮膚感作性に関して IATA に用いられるデータ統合体系的アプローチや個々の情報源を報告するガイダンス文書の中で、OECD は現時点で、さまざまな検査戦略や予測モデルを報告するいくつもの症例研究を検討している。このうちのひとつが、U-SENS アッセイに基づくものである（5）。背景データや既存の妥当なヒトデータなどのほかの情報を U-SENS™データと併用した例（6）も、別の文献に報告されている（4）（5）（7）。

3. U-SENS™は、細胞培養技術とフローサイトメトリー分析の経験がある実験室への技術移管が可能であることが確認されている。本試験法に見込まれる予測結果の再現性は、同一施設内および複数の施設間でそれぞれ、90%および 84%であった（8）。バリデーション試験（8）および発表された他の研究（1）から得られたすべての結果によると、LLNA の結果と比較した場合、皮膚感作性物質（UN GHS カテゴリー1）と非感作性物質とを識別する正確度は 86%（N=166）、感度は 91%（118/129）、特異度は 65%（24/37）であった。ヒトでの結果と比較した場合、皮膚感作性物質（UN GHS カテゴリー1）と非感作性物質とを識別する正確度は 77%（N=101）、感度は 100%（58/58）、特異度は 47%（20/43）であった。U-SENS™の偽陰性結果の予測を LLNA と比較すると、皮膚感作性が高い化学物質（UN GHS サブカテゴリー1A）よりも、皮膚感作性が低いか中程度の化学物質（UN GHS サブカテゴリー1B）に認める可能性が高い（1）（8）（9）。総合すると、上記情報は U-SENS™が皮膚感作性の有害性を識別するのに有用であることを示している。ただし、U-SENS™は、IATA に基づく他の情報を併用し、「はじめに」の段落 7 および 8 の条項に従って検討されるべきであることから、U-SENS™を単独の試験法として算出した正確度の値は指標にすぎない。さらに、動物を用いない皮膚感作性試験法を評価する場合、LLNA 試験もそのほかの動物試験も、ヒトにおける皮膚感作性を完全に反映しているとはいえないことに留意すべきである。

4. 現在入手可能なデータによると、U-SENS™は、さまざまな有機官能基、物理化学的特性、皮膚感作性強度（in vivo 試験で判定される）や、皮膚感作性を生じることがわかっている一連の反応メカニズム（マイケル受容体、シッフ塩基形成、アシル転移剤、2 分子的求核置換［SN2］または芳香族求核置換反応［SNAr］）などにまたがる被験物質（保存料、界面活性剤、活性剤、

© OECD 2018

色素などの化粧品成分を含む）に適用可能であることが示された（1）（8）（9）（10）。U-SENS™は、適切な溶媒／媒体（段落 13 参照）に可溶であるか安定した分散液（被験物質が沈殿することも、溶媒／媒体から分離して異相を示すこともないコロイドまたは懸濁液）となる被験物質に適用可能である。プレハプテン（酸化により活性化される物質）やプロハプテン（酵素 P450 を介するなど酵素による活性化を要する物質）とされるデータセットの化学物質を、U-SENS™によって正しく予測することができた（1）（10）。膜破壊物質は、非特異的 CD86 発現増加を生じることから、偽陽性となることがあり、*in vivo* での基準分類に関連して、偽陽性 7 件中 3 件が界面活性剤であった（1）。界面活性剤に陰性結果を認めた場合、被験物質が非感作性物質であるとの判断を後押しするものの、界面活性剤に認めた上記のような陽性結果の判断は慎重を要する。蛍光被験物質は U-SENS™で評価できるが（1）、フルオレセイン・イソチオシアネート（FITC）またはヨウ化プロピジウム（PI）と同じ波長の強い蛍光被験物質は、フローサイトメトリーによる検出を干渉するため、FITC 標識抗体（偽陰性の可能性）または PI（細胞生存率測定不能）を用いて正確に評価できない。このような場合、補遺 II 収載の習熟度確認物質による FITC 標識抗体または PI（段落 18 参照）と同様の結果をもたらすことが示される場合に限り、他の蛍光色素で標識された抗体、または他の細胞毒性マーカーを用いることができる。上記を踏まえて、界面活性被験物質の陽性結果や、強い蛍光被験物質の陰性結果は、示されている限界や、IATA の枠組み内の他の情報源に照らして解釈する必要がある。他の特定のカテゴリーに属す被験物質に U-SENS™ を適用できない証拠がある場合、U-SENS™をそのようなカテゴリーに属す物質に用いるべきではない。

5. 上記の通り、U-SENS™は、皮膚感作性物質と非感作性物質との識別を後押しすることができる。一方、IATA などの統合的アプローチの中で用いられた場合、感作性の強度の評価が可能な場合もある。とはいえ、U-SENS™の成績が、どのように強度評価に情報を与えるのかを特定するには、ヒトデータに基づいた一層の研究が必要である。

6. 用語の定義を補遺 I に示す。

試験の概要

7. U-SENS™は、被験物質曝露 45±3 時間後に、ヒト組織球性リンパ腫細胞株である U937 細胞の CD86 細胞表面マーカー発現の変化を定量する *in vitro* 試験である。CD86 表面マーカーは、典型的な U937 活性化マーカーのひとつである。CD86 は、共刺激分子であることがわかっており、T 細胞プライミングに重要な役割を担う単球活性化を再現すると考えられる。典型的にはフルオレセイン・イソチオシアネート（FITC）で標識された抗体で細胞を染色したあと、CD86 細胞表面マーカー発現の変化をフローサイトメトリーで測定する。CD86 細胞表面マーカー発現のアップレギュレーションが、細胞毒性に達しない濃度で生じているか評価するため、同時に細胞毒性も（例えば、PI を用いて）測定する。溶媒／媒体対照との比較で CD86 細胞表面マーカーの刺激指数（S.I.）を算出し、感作性物質と非感作性物質とを識別するための予測モデル（段落 19 参照）に使用する。

習熟度の立証

© OECD 2018

8. 試験法ガイドライン 442E の付属書に記載されている試験法を日常的に用いるのに先立ち、実施施設は、Good *in vitro* Method Practices（11）に準拠して補遺 II 収載の習熟度確認用の 10 物質を用いて技術的習熟度を立証する。さらに、本試験法使用者は、反応性のチェック（段落 11 参照）と、陽性対照および溶媒／媒体対照（段落 15～16 参照）により得られたデータの背景データベースを保持し、このようなデータを用いて、実施施設での本試験法の再現性が経時的に維持されていることを確認する。

試験手順

9. 本試験法は、U-SENS™に関する動物実験代替法データベースサービス（DB-ALM）プロトコル番号 183（12）に基づいている。実施施設において U-SENS™を導入し使用する場合、標準操作手順（SOP）を用いる必要がある。例えば補遺 II の習熟度確認物質の試験によって同様の結果をもたらすことが示されれば、U-SENS™自動測定システムを使用してよい。U-SENS™の主要な構成要素および手順について以下に記す。

細胞の調製

10. U-SENS™の実施には、ヒト組織球性リンパ腫細胞株 U937（13）を使用する。American Type Culture Collection（ATCC）のような十分な適正資格をもつ細胞バンクから、細胞（クローン CRL1593.2）を入手すること。

11. U937 細胞は室温 37°C、5% CO_2 の加湿雰囲気下で、10%ウシ胎児血清（FCS）、2 mM L-グルタミン、100 単位/mL ペニシリンおよび 100 µg/mL ストレプトマイシンを添加した RPMI-1640 培地（完全培地）で培養する。U937 細胞は、2～3 日に 1 回、定期的に密度 1.5×10^5cells/mL または 3×10^5cells/mL で播種する。細胞密度が 2×10^6 cells/mL を超えてはならない。また、トリパンブルー色素排除法で測定した細胞生存率が 90%以上でなければならない（融解後第一継代には適用されない）。試験に使用する前に、細胞の全ロット、FCS や抗体について反応性のチェックを行い、適正であることを判断する。細胞の反応性チェックは、陽性対照であるピクリルスルホン酸（2,4,6-トリニトロ-ベンゼン-スルホン酸：TNBS）（CAS 番号：2508-19-2、純度 99%以上）および陰性対照である乳酸（LA）（CAS 番号：50-21-5、純度 85%以上）を用いて、解凍から 1 週間以上後に実施する。反応性のチェックには、2 つの対照のそれぞれに、6 種類の最終濃度を検討する（TNBS：1、12.5、25、50、75、100 µg/mL および LA：1、10、20、50、100、200 µg/mL）。完全培地に溶解した TNBS が、陽性および濃度依存性の CD86 反応を生じ（陽性の濃度 CD86 S.I. ≥150 と、そのあとの CD86 S.I の増加）、完全培地に溶解した LA が CD86 の陰性反応を生じる必要がある（段落 21 参照）。2 回の反応性チェックで適正と判断された細胞ロットのみを試験で使用する。細胞は、解凍後、最長 7 週間を限度に増殖させることが可能である。継代数は 21 回を超えてはならない。反応性チェックは、段落 18～22 に記載の手順に従って実施する。

12. 試験では、3 x 10^5 cells/mL または 6×10^5cells/mL の密度で U937 細胞を播種し、それぞれ 2 日間または 1 日間、培養フラスコで前培養する。十分な科学的妥当性が提示されるほかに、例えば、補遺 II 収載の習熟度確認物質の試験により、同様の結果をもたらすことが示されれば、ここに挙げたもの以外の前培養条件を使用してもよい。試験当日、培養フラスコから採取した細胞を、5×10^5 cells/mL で新たな培養液に再懸濁する。次に、96 ウェル平底プレートに 100 µL（最終細胞密度 0.5×10^5 cells/well）の細胞を播種する。

© OECD 2018

被験物質および対照物質の調製

13. 試験実施前に被験物質の溶解性を確認する。この目的のために、被験物質を、溶媒の第一候補として完全培地を用いて、50 mg/mL の濃度で溶解または安定的に分散させる。完全培地溶媒／媒体に被験物質が不溶である場合、第二候補としてジメチルスルホキシド（DMSO、純度99%以上）に溶解、または安定的に分散させる。被験物質が溶媒／媒体に溶解する場合、完全培地に最終濃度 0.4 mg/mL になるように被験物質を溶解する。被験物質が DMSO にしか溶解しない場合は、濃度 50 mg/mL で被験物質を溶解する。十分な科学的根拠を提示できる場合は、上記以外の溶媒／媒体を使用してよい。最終的な溶媒／媒体における被験物質の安定性を考慮する必要がある。

14. 被験物質および対照物質は、試験当日に調製する。U-SENS™では用量設定試験を行わないため、初回実験では、6 種類の最終濃度（1、10、20、50、100 および 200 µg/mL）となるように、完全培地または 0.4% DMSO 含有培地の対応する溶媒／媒体で調製し、実験を行うべきである。2 回目以降の実験では、完全培地に 0.4% DMSO または DMSO に 50 mg/mL の被験物質溶液から開始し、少なくとも 4 種類の作業用溶液（少なくとも 4 種類の濃度）を、対応する溶媒／媒体を用いて調製する。作業用溶液は最終的に、プレートの作業用溶液と等量の U937 細胞懸濁液（上記段落 11 参照）を添加することによりさらに 2 倍に希釈されて処置に用いられる（12）。ここからさきの測定のための濃度（少なくとも 4 種類の濃度）は、これまでの実験結果に基づいて選択する（8）。使用しうる最終濃度は、1、2、3、4、5、7.5、10、12.5、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、120、140、160、180 および 200 µg/mL である。最高最終濃度は 200 µg/mL である。1 µg/mL で CD86 陽性値を認めた場合、陽性閾値を超える CD86 を生じない被験物質濃度をみつけるために、次に 0.1 µg/mL を評価する。CD86 陽性濃度反応を認めた場合、測定毎に、EC150（CD86 陽性閾値である 150%に達する被験物質の濃度、段落 19 参照）を求める。被験物質が、陽性 CD86 反応を生じるが、濃度依存性を示さない場合、U-SENS™ DB-ALM プロトコル番号 183 （12）に記載したように、EC150 を算出しても意味がないと考えられる。測定毎に、CV70（細胞毒性閾値である 70%に達する被験物質濃度、段落 19 参照）をできる限り求める（12）。CD86 増加の濃度反応効果を検討するため、使用しうる濃度からいずれかの濃度を選択する。このとき、EC150 （または CD86 陰性無細胞毒性濃度の最高値）と CV70 （または可能な最高濃度［200 µg/mL］）との間に均等に散らばるように選択する。測定あたり 4 種類以上の濃度を検討し、比較のため、このうち 2 種類以上を前回の測定に用いた濃度とする。

15. U-SENS™に用いる溶媒／媒体対照は、完全培地（被験物質が溶解または安定的に分散する場合）（段落 4 参照）または 0.4%DMSO 含有完全培地（被験物質が DMSO に溶解または安定的に分散する場合）である。

16. U-SENS™に用いる陽性対照は、完全培地で調製した TNBS（段落 11 参照）である。TNBS は CD86 発現測定の陽性対照として、プレートの最終濃度 1 種類（50 µg/mL）で、細胞生存率が 70%を上回ることを確認する。TNBS がプレート中に 50 µg/mL となるようにするには、1 M の TNBS 保存原液（293 mg/mL）を完全培地で調製し、2,930 倍希釈することで 100 µg/mL の作業用溶液を得る。乳酸（LA、CAS 50-21-5）を、陰性対照物質として完全培地中に 200 µg/mL となるよう溶解したものを使用する（0.4 mg/mL 保存原液から）。各実験のプレート毎に、完全培地無処置区、溶媒／媒体対照区、陰性対照区および陽性対照区を 3 回ずつ設定する（12）。背景データがあり、ほぼ同じ実施許容基準を満たせば、これ以外の適切な陽性対照を用いることができる。実施許容基準は、被験物質について記載された基準（段落 12 参照）と同一である。

© OECD 2018

被験物質および対照物質の適用

17. 段落 14～16 に記載の溶媒／媒体対照または作業用溶液を、96 ウェル平底プレート（段落 12 参照）で、調製した細胞懸濁液と 1：1（v/v）で混合する。次に、処理したプレートを 5% CO_2 存在下に、37°C で 45±3 時間インキュベートする。インキュベートの前に、プレートを半透膜でシールし、揮発性の被験物質の蒸発やウェル間での被験物質の交差汚染を回避する（12）。

細胞の染色

18. 曝露から 45±3 時間経過後、細胞を V 底マイクロタイタープレートへ移し、遠心分離により採取する。溶解に関する悪影響として、処理 45±3 時間後（細胞染色前）に結晶または液滴が顕微鏡下に認められることと定義する。上清を捨て、残った細胞を 100 µL の氷冷 5%ウシ胎児血清含有リン酸緩衝生理食塩水（PBS）（染色用緩衝液）で 1 回洗浄する。遠心分離後、細胞を 100 µL の染色用緩衝液で再懸濁し、遮光下に 4°C で 30 分間、5 µL（0.25 µg）の FITC 標識抗 CD86 抗体またはマウス IgG1（アイソタイプ）抗体を用いて染色する。U-SENS™ DB-ALM プロトコル番号 183（12）に記載の抗体を使用すること（CD86：BD-PharMingen #555657 クローン：Fun-1 または Caltag/Invitrogen # MHCD8601 クローン：BU63;および IgG1：BD-PharMingen #555748、または Caltag/Invitrogen # GM4992）。試験法開発者の経験に基づき、抗体の蛍光強度は、通常、異なるロット間で同じである。反応性チェックに合格したものであれば、別のクローンや供給業者の抗体をアッセイに使用してもよい（段落 11 参照）。ただし、使用者が自身の試験施設の条件で抗体濃度を漸増減し、最適な濃度を決める必要がある。他の蛍光色素で標識された抗 CD86 抗体の検出システムについては、例えば、補遺 II 収載の習熟度確認物質の試験により、FITC 標識抗体と同様の結果をもたらすことが示されれば用いることができる。100 µL の染色用緩衝液で 2 回、100 µL の氷冷 PBS で 1 回洗浄後、細胞を氷冷 PBS に再懸濁し（サンプルを手で試験管 1 本ずつ分析する場合は 125 µL、自動サンプラープレートを用いる場合は 50 µL）、PI 溶液を添加する（最終濃度 3 µg/mL）。例えば、補遺 II の習熟度確認物質の試験により、別の染色が PI と同様の結果を示す場合、7-アミノアクチノマイシン D（7-AAD）またはトリパンブルーからなる他の細胞毒性マーカーを使用することが可能である。

フローサイトメトリー分析

19. CD86 の発現量および細胞生存率を、フローサイトメトリーを用いて分析する。細胞を、対数尺度を用いたサイズ（FSC）および粒度（SSC）のドットプロットで示す。これにより、first gate R1 の集団を明確に特定し、デブリを排除することができる。各ウェルにつき、gate R1 に合計 10,000 細胞を得ることを目標にする。同じ R1 gate から得た細胞を、FL3 または FL4／SSC ドットプロットで示す。ヨウ化プロピジウム陰性細胞集団を選択する別の gate R2 を設けることによって、生細胞を明確にする（FL3 または FL4 チャンネル）。細胞生存率は、サイトメーター解析プログラムにより、以下の式を用いて算出される。細胞生存率が低い場合は、死細胞を含む最大 2 万個の細胞からなるデータを取得する。あるいは、分析開始後 1 分間で得られるデータを取得する。

$$\text{細胞生存率} = \frac{\text{生細胞数}}{\text{観察総細胞数}} \times 100$$

© OECD 2018

次に、R2 でゲートされた生細胞中（R1 で）の FL1-陽性細胞の割合を測定する。細胞表面の CD86 発現を、生細胞（R2）でゲートした FL1／SSC ドットプロットを用いて分析する。
完全培地／IgG1 ウェルの場合、分析マーカーを主要集団に近接して設定し、完全培地対照の IgG1 が目標ゾーン 0.6～0.9%にあるようにする。
色素に関する悪影響は、FITC 標識 IgG1 ドットプロットのシフトと定義される（IgG1 FL1 幾何平均 S.I. ≥ 150%）。

対照細胞（無処理または 0.4%DMSO）および被験物質曝露細胞の CD86 の刺激指数（S.I.）を、次式に基づいて算出する：

$$S.I. = \frac{\text{被験物質処理 } CD86^+ \text{ 細胞の\% - 被験物質処理 } IgG1^+ \text{ 細胞の\%}}{\text{対照 } CD86^+ \text{ 細胞の\% - 対照 } IgG1^+ \text{ 細胞の\%}} \times 100$$

無処理対照 $IgG1^+$ 細胞の%： 無処理生細胞中の、分析マーカーで規定される（許容範囲 0.6%以上 1.5%未満、段落 22 参照）FL1 陽性 IgG1 細胞の割合を指す。
$IgG1^+$／$CD86^+$の対照／被験物質処理細胞の%： 対照／被験物質処理生存細胞における分析マーカーを動かさずに測定した FL1-陽性 IgG1／CD86 細胞の割合を指す。

データおよび報告

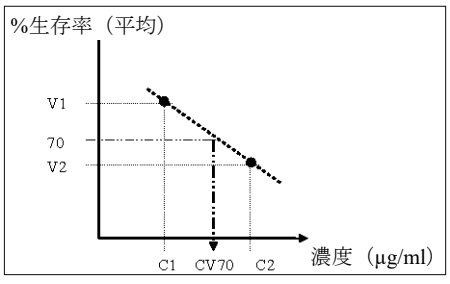
データの評価

20. 下記パラメータを U-SENS™試験法で求める：CV70 値、具体的には、U937 の細胞生存率が 70%を示す被験物質濃度（30%毒性）。EC150 値、具体的には、CD86 の刺激指数（S.I.）が 150%を示す被験物質濃度。

CV70 は、以下の式を用いて対数線形補間により算出する：

CV70 = C1 + [(V1 - 70) / (V1 – V2) * (C2 – C1)]

ここで：
V1 は、細胞生存率が 70%以上となる最小の生存率
V2 は、細胞生存率が 70%未満となる最大の生存率
C1 および C2 は、それぞれ V1 および V2 の細胞生存率を示す被験物質濃度。



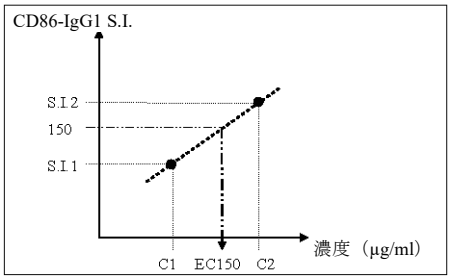
CV70 値を求める他のアプローチについては、（例えば、習熟度確認物質の試験により）結果に影響を与えないということが証明されれば使用することができる。

EC150 は、以下の式を用いて対数線形補間により算出する：

© OECD 2018

EC150 = C1 + [(150 – S.I.1) / (S.I.2 – S.I.1) * (C2 – C1)]

ここで：
C1 は、CD86 S.I.値が 150%未満の、µg/mL で表した最大被験物質濃度(S.I.1)
C2 は、CD86 S.I.値が 150%以上の、µg/mL で表した最小被験物質濃度(S.I.2).



下記について、EC150 値および CV70 値を算出する
- 測定毎： EC150 値および CV70 値を、CD86 増加の濃度反応効果を検討するツールとして使用する（段落 14 参照）
- 平均生存率に基づいて、全体での CV70 を求める（12）
- DC86 値の平均 S.I.に基づいて、U-SENS™を用いて陽性と予測される被験物質に対する全体での EC150 を求める（段落 21 参照）（12）

予測モデル

21. CD86 発現測定では、被験物質の各測定は少なくとも 4 濃度、少なくとも 2 回の独立した測定（別日に実施）を行って、ひとつの予測を得る（陰性もしくは陽性）。

- CD86 の S.I.値が、検査に供した細胞毒性のない（細胞生存率が 70%以上）すべての濃度で 150%未満であり、しかも結果に影響を及ぼすような要因がない場合（細胞毒性、溶解性：段落 18 参照、色素：段落 19 参照、悪影響を認める無細胞毒性濃度とは無関係）、U-SENS™のその測定の結論を陰性（これ以後、N と記載する）と判断する。陰性以外のすべての場合：CD86 の S.I.値が 150%以上および／または結果に影響を及ぼすような要因が存在する場合、U-SENS™のその測定における結論を陽性（これ以後、P と記載する）と判断する。

- 少なくとも 2 回の独立した測定において陰性であれば U-SENS™における予測は陰性（N）とする（図 1）。最初の 2 回の測定がどちらも陰性（N）であれば、U-SENS™予測を陰性と判断し、3 回目の測定は行う必要がない。

- 少なくとも 2 回の独立した測定が陽性（P）であれば、U-SENS™における予測を陽性とする（図 1）。最初の 2 回の測定がどちらも陽性（P）であれば、U-SENS™における予測を陽性とし、3 回目の測定は行う必要がない。

- 用量設定試験を行わないことから、最初の測定において細胞毒性の見られない最も高い濃度でのみ CD86 発現の S.I.値が 150%以上であった場合を例外とする。この測定結果を不十分（Not Conclusive： NC）と判断し、濃度を追加（最高無毒性濃度と最低細胞毒性濃度との間—段落 20 参照）して、追加の測定を実施する必要がある。測定結果が NC とされた場合、少なくとも別途 2 回実施する。2 回目と 3 回目の結果が分かれた場合は 4 回目の測定を行う（独立に N および／

© OECD 2018

または P）（図 1）。2 回目以降の測定では、細胞毒性のない最も高い濃度でのみ CD86 が 150% 以上であったとしても、その測定を陽性と判断する。その理由は、当該被験物質に対して濃度設定を調整したことによる。

最終予測は、3 回または 4 回の測定それぞれの結果の多い方に基づく（3 回のうち 2 回、4 回のうち 2 回）（図 1）。

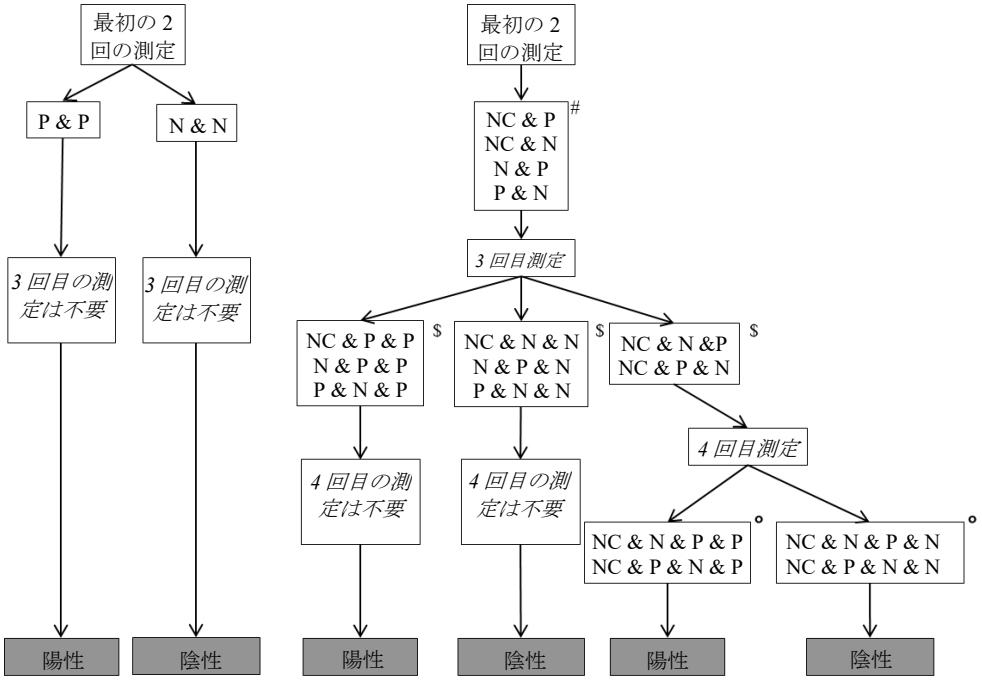


図 1：U-SENS™に用いられる予測モデル.U-SENS™による予測は、IATA の枠組みの中で、また、段落 4 の条項および「はじめに」の段落 7、8 および 9 に従って検討すること。

N：CD86 陽性を認めず、結果に影響を及ぼすような事象が認められない場合;
P：CD86 が陽性および／または、結果に影響を及ぼすような事象が認められる場合;
NC：不十分。最初の測定で、細胞毒性のない最高濃度でのみ CD86 の陽性反応が認められた場合は不十分;
#：最初の測定にのみ不十分（NC）を個別の結論に認めた場合は自動的に
3 回目の測定が必要となり、独立の 3 回の測定のうち 2 回以上からなる陽性（P）または陰性（N）の多い方の結論となる。
$：上記ボックスに示す最初の 2 回の測定で得た結果に基づいて実施された 3 回目までの測定結果の組合せを当該ボックスに示す。
°：上記ボックスに示す最初の 3 回の測定結果に基づいて実施された 4 回目までの測定結果の組合せを当該ボックスに示す。

許容基準

© OECD 2018

22. U-SENS™ を用いる場合、次の許容基準を満たす必要がある（12）。

- 45±3 時間の被験物質曝露終了時に、3 回反復の無処置 U937 の細胞生存率の平均が 90%より高く、CD86 発現率にドリフトが認められない。無処置 U937 細胞の CD86 基礎発現率が 2%以上 25%以下である。
- DMSO を溶媒とした場合、DMSO 媒体対照区の有効性を、無処置細胞と比較した DMSO S.I. を求めることによって評価し、3 回反復の細胞生存率の平均が 90%より高くなければならない。DMSO 媒体対照区 3 回反復の CD86 S.I.の平均が、無処置 U937 細胞 3 回反復の CD86 S.I. の平均の 250%未満であれば、DMSO 媒体対照は有効である。
- 無処置 U937 細胞の IgG1 値について、3 回測定のうち少なくとも 2 回が 0.6%以上 1.5%未満である場合に、測定が有効であると考える。
- 同時に測定した陰性対照区（乳酸）について、3 回反復のうち 2 回反復以上が陰性（CD86 S.I.が 150%未満）で、無細胞毒性（細胞生存率 70%以上）である場合に、同時に測定した陰性対照区を有効であると考える。
- 陽性対照区（TNBS）の 3 回反復中 2 回反復が陽性（CD86 S.I.が 150%以上）で、無細胞毒性（細胞生存率 70%以上）である場合に、陽性対照区（TNBS）を妥当と考える。

試験報告書

23. 試験報告書には以下の情報を含む。

被験物質

- 単一成分物質
    - 化学的識別情報、例えば IUPAC または CAS 名、CAS 番号、SMILES または InChI コード、構造式および／またはそれ以外の識別に有用な情報;
    - 外観、完全培地への溶解度、DMSO への溶解度、分子量および入手可能な範囲のその他の関連する物理化学的性質;
    - 必要に応じ、また実質的に実行可能な場合の純度、不純物の化学的同定など;
    - 該当する場合、試験前の処理（例えば、加温、粉砕）;
    - 試験濃度;
    - 入手可能な範囲の保存条件および安定性;
    - 各被験物質に対する溶媒／媒体選択の妥当性。
- 多成分物質、UVCB 物質および混合物：
    - 入手可能な範囲の成分の化学的同定（上記参照）、純度、含有量および関連のある物

© OECD 2018

理化学的性質（上記参照）などによるできる限りの成分の特性;

- 外観、完全培地への溶解度、DMSO への溶解度および入手可能な範囲のその他の関連する物理化学的性質;
- 既知組成の混合物／ポリマーの場合、分子量もしくは見かけの分子量、または試験実施に関連するそれ以外の情報;
- 該当する場合、試験前の処理（例えば、加温、粉砕）;
- 試験濃度;
- 入手可能な範囲の保存条件および安定性;
- 各被験物質に対する溶媒／媒体選択の妥当性。

対照物質

- 陽性対照

- 化学的識別情報、例えば IUPAC または CAS 名、CAS 番号、SMILES または InChI コード、構造式および／またはそれ以外の識別に有用な情報;
- 外観、DMSO への溶解度、分子量および入手可能な範囲で該当する場合、その他の関連する物理化学的性質;
- 必要に応じ、また実質的に実行可能な場合の純度、不純物の化学的同定など;
- 該当する場合、試験前の処理（例えば、加温、粉砕）;
- 試験濃度;
- 入手可能な範囲の保存条件および安定性;
- 該当する場合、適切な実施許容基準であることを示す陽性対照結果の背景データ。

- 陰性および溶媒／媒体対照

- 化学的識別情報、例えば IUPAC または CAS 名、CAS 番号、SMILES または InChI コード、構造式および／またはそれ以外の識別に有用な情報;
- 必要に応じ、また実質的に実行可能な場合の純度、不純物の化学的同定など;
- 本試験法ガイドラインに記載以外の別の対照溶媒／媒体を用いる場合、外観、分子量、および入手可能な範囲のその他の関連する物理化学的性質;
- 入手可能な範囲の保存条件および安定性;
- 各被験物質に対する溶媒／媒体選択の妥当性。

試験法の条件

© OECD 2018

- 試験依頼者名、試験施設名、試験責任者名および住所;
- 試験法の説明;
- 細胞株、その保存条件および供給元（細胞株を入手した施設など）;
- フローサイトメトリー（機種など）、機器の設定内容、抗体、ならびに細胞毒性マーカー;
- 習熟度評価用物質や試験法の検討により、本試験法実施における実施施設の習熟度を示し、経時的な試験法の再現性を立証するのに用いた手順。これには、背景対照データおよび／または反応性確認の背景データなどがある。

試験許容基準

- 許容範囲と比較した溶媒／媒体対照から得られた細胞生存率および CD86 S.I 値;
- 許容範囲と比較した、陽性対照から得られた細胞生存率および S.I.値;
- 被験物質の全試験濃度における細胞生存率。

試験手順

- 測定実施数;
- 被験物質の濃度、適用、曝露時間（推奨事項と異なる場合）;
- 曝露期間;
- 評価および測定基準の記述;
- 試験手順の修正があればその記述。

結果

- 測定ごとに被験物質および陽性対照について得られた CV70 値（該当する場合）、S.I.、細胞生存率、EC150 値（該当する場合）のデータの一覧表、ならびに予測モデルに従って得られた被験物質の評価の提示;
- 該当する場合、それ以外に関連する知見があればその記述。

結果の考察

- U-SENS™を用いて得られた結果の考察;
- 他の関連情報が入手可能な場合、IATA の範囲内における試験結果の考察。

結論

© OECD 2018

文献

1. Piroird, C., Ovigne, J.M., Rousset, F., Martinozzi-Teissier, S., Gomes, C., Cotovio, J., Alépée, N. (2015). The Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS) addresses the activation of dendritic cell event in the adverse outcome pathway for skin sensitization. *Toxicol. In Vitro* 29, 901-916.
2. EURL ECVAM (2017). The U-SENS™ test method Validation Study Report. Accessible at: http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations
3. EC EURL ECVAM (2016). ESAC Opinion No. 2016-03 on the L'Oréal-coordinated study on the transferability and reliability of the U-SENS™ test method for skin sensitisation testing. EUR 28178 EN; doi 10.2787/815737. Available at: [http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103705].
4. EC EURL ECVAM (2017). EURL ECVAM Recommendation on the use of non-animal approaches for skin sensitisation testing. EUR 28553 EN; doi 10.2760/588955. Available at: [https://ec.europa.eu/jrc/en/publication/eur-scientific-and-technical-research-reports/eurl-ecvam-recommendation-use-non-animal-approaches-skin-sensitisation-testing].
5. Steiling, W. (2016). Safety Evaluation of Cosmetic Ingredients Regarding their Skin Sensitization Potential. doi:10.3390/cosmetics3020014.*Cosmetics* 3, 14.
6. OECD (2016). Guidance Document On The Reporting Of Defined Approaches And Individual Information Sources To Be Used Within Integrated Approaches To Testing And Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, Series on Testing & Assessment No. 256, ENV/JM/MONO(2016)29. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm].
7. Urbisch, D., Mehling, A., Guth, K., Ramirez, T., Honarvar, N., Kolle, S., Landsiedel, R., Jaworska, J., Kern, P.S., Gerberick, F., Natsch, A., Emter, R., Ashikaga, T., Miyazawa, M., Sakaguchi, H. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 71, 337-351.
8. Alépée, N., Piroird, C., Aujoulat, M., Dreyfuss, S., Hoffmann, S., Hohenstein, A., Meloni, M., Nardelli, L., Gerbeix, C., Cotovio, J. (2015). Prospective multicentre study of the U-SENS test method for skin sensitization testing. *Toxicol In Vitro* 30, 373-382.
9. Reisinger, K., Hoffmann, S., Alépée, N., Ashikaga, T., Barroso, J., Elcombe, C., Gellatly, N., Galbiati, V., Gibbs, S., Groux, H., Hibatallah, J., Keller, D., Kern, P., Klaric, M., Kolle, S., Kuehnl, J., Lambrechts, N., Lindstedt, M., Millet, M., Martinozzi-Teissier, S., Natsch, A., Petersohn, D., Pike, I., Sakaguchi, H., Schepky, A., Tailhardat, M., Templier, M., van Vliet, E., Maxwell, G. (2014). Systematic evaluation of non-animal test methods for skin sensitisation safety assessment. *Toxicol. In Vitro* 29, 259-270.
10. Fabian, E., Vogel, D., Blatz, V., Ramirez, T., Kolle, S., Eltze, T., van Ravenzwaay, B., Oesch, F., Landsiedel, R. (2013). Xenobiotic metabolizin enzyme activities in cells used for testing skin sensitization *in vitro*. *Arch. Toxicol.* 87, 1683-1696.
11. OECD. (2017). Draft Guidance document: Good *In Vitro* Method Practices (GIVIMP) for the Development and Implementation of *In Vitro* Methods for Regulatory Use in Human Safety Assessment. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECD%20Draft%20GIVIMP_v05%20-%20clean.pdf].

© OECD 2018

12. DB-ALM (2016). Protocol no. 183: Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS™), 33pp. Accessible at: [http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/].

13. Sundström, C., Nilsson, K. (1976). Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int. J. Cancer* 17, 565-577.

14. OECD (2005). Series on Testing and Assessment No. 34: Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm].

15. United Nations UN (2015). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). ST/SG/AC.10/30/Rev.6, Sixth Revised Edition,New York & Geneva: United Nations Publications. Available at: [http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/English/ST-SG-AC10-30-Rev6e.pdf].

16. OECD (2012). Series on Testing and Assessment No. 168: The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm].

17. ECETOC (2003). Technical Report No. 87: Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals, Brussels. Available at: [https://ftp.cdc.gov/pub/Documents/OEL/06.%20Dotson/References/ECETOC_2003-TR87.pdf].

© OECD 2018

補遺 I

定義

正確度：試験法による結果が、一般的に認められた参照値にどの程度一致するかを示す近似性の指標。試験法の性能の尺度であり、妥当性の一側面である。この用語は、多くの場合、試験法の正確な結果の割合を意味する一致性と同義的に用いられる（14）。

AOP（有害性発現経路）：分子レベルの初期イベントから検討対象の *in vivo* 転帰まで、標的化学物質または一群の類似化学物質の化学構造から生じる一連の事象（15）。

CD86 濃度反応：陽性濃度（CD86 S.I. ≥ 150）の確認後にさらに高い CD86 S.I.を示す濃度を認めた場合、濃度依存性（濃度反応性）がある。

CV70：細胞生存率が 70%を示す予測濃度。

ドリフト：ドリフトを、i) 無処置対照実験第 3 回反復の修正%$CD86^+$ 値が、無処置対照実験第 1 回反復および第 2 回反復の修正%$CD86^+$ 値の平均の 50%を下回る場合、および ii) 陰性対照実験第 3 回反復の修正%$CD86^+$ 値が、陰性対照実験の第 1 回反復および第 2 回反復の修正%$CD86^+$ 値の平均の 50%を下回る場合と定義する。

EC150：CD86 発現において、150% S.I.を示す予測濃度。

フローサイトメトリー：液体で懸濁された細胞が、細胞およびその構成成分の特徴に応じて散乱する励起光の焦点を通って一度に 1 つずつ流れる細胞測定法。最初に光を吸収し、次に変化した周波数を放出するよう、多くの場合、細胞が蛍光マーカーで標識される。

有害性：生物、生物系、または（その下位に属す）生物集団がある物質に曝露された場合、悪影響を引き起こす可能性がある物質固有の性質または状態のこと。

IATA（試験および評価に関する統合的アプローチ）：ある化学物質または一群の化学物質の危険有害性の同定（可能性）、危険有害性の特徴付け（効力）および／または安全性評価（可能性／効力および曝露）に用いられる体系的アプローチ。本アプローチでは、関連性があるデータをすべて戦略的に統合し重み付けを行うことにより、危険有害性の可能性および／またはリスクおよび／または、さらに的を絞った最小限となる試験の必要性について、規制上の意思決定情報を与える。

混合物：互いに反応しない 2 つ以上の物質からなる混合物または溶液。

単一成分物質：定量的組成に、1 主要成分が 80%（w/w）以上存在することにより定義される物質。

多成分物質：その定量的組成に、2 つ以上の主要成分が濃度 10%（w/w）以上と 80%（w/w）未満で存在することにより定義される物質。

© OECD 2018

多成分物質は製造過程の結果得られる。混合物と多成分物質との違いは、混合物の場合、2 つ以上の物質が化学反応を起こさず混合することにより得られるのに対し、多成分物質は化学反応の結果得られることにある。

陽性対照：試験系のすべての構成成分を含み、陽性反応を誘導することが知られている物質で処理を反復する対照。陽性対照反応の経時的変化を評価できるように、陽性反応の大きさが過剰であってはならない。

プレハプテン：酸化などの非生物的な変換を通じて感作性物質となる化学物質。

プロハプテン：皮膚感作性を有するために、酵素による活性化を要する化学物質。

妥当性：試験と検討対象の影響との関係と、試験が特定の目的にとって意義や有用性があるかを示す用語。試験が試験対象となる生物学的影響を正確に測定または予測できる程度を示す。妥当性は、試験法の正確性（一致度）の考察を含む（14）。

信頼性：同じプロトコルを用いて試験法を実施したときに得られる経時的な実験室内および実験室間再現性の程度を表す尺度。実験室内再現性および実験室間再現性ならびに実験室内の繰り返し精度の算出により評価される（14）。

測定：溶媒／媒体対照および陽性対照で同時に検討される 1 つ以上の被験物質から成る一組の試験。

感度：すべての陽性化学物質や活性化学物質のうち、試験によって正確に分類されるものの割合。分類的な結果をもたらす試験法の正確性を示す尺度であり、試験法の妥当性を評価する上で考慮することが重要である（14）。

S.I.：刺激指数。溶媒で処理した細胞との比較によって得られる化学物質で処理した細胞の幾何平均蛍光強度の相対値。

溶媒／媒体対照：用いる溶媒／媒体を含んだ試験系のすべての構成成分を含むが、被験物質は除いてある未処理サンプルのこと。同じ溶媒／媒体に溶解、または安定的に分散した被験物質で処理したサンプルについて、ベースラインの反応を確認するために用いられる。培地対照を同時に用いた試験の場合、本サンプルは、溶媒／媒体と試験系との相互作用の有無も示す。

特異度：すべての陰性や不活性な化学物質のうち、試験によって正確に分類されるものの割合。分類的な結果をもたらす試験法の正確性を示す尺度であり、試験法の妥当性を評価する上で考慮することが重要である（14）。

染色用緩衝液：5%ウシ胎児血清含有リン酸緩衝生理食塩水。

物質：自然の状態または製造過程で得られる化学元素とその化合物のことをいい、その製品の安定性を保つために必要な添加物や、その使用工程から派生する不純物は含まれるが、その物質の安定性に影響を及ぼすことも、その組成を変化させることもなく分離する可能性のある溶媒は除く。

© OECD 2018

被験物質：「被験物質」という用語は、試験対象であることをいう場合に用いる。

国連勧告「化学品の分類および表示に関する世界調和システム」（UN GHS）：人々（雇用主、労働者、輸送担当者、消費者、緊急時対応者など）および環境を守るために、危険有害作用に関する情報を伝達することを目的として、物理学上、健康上および環境上の有害性の種類およびレベルの基準に従って化学品（物質および混合物）の分類法を提案するとともに、絵表示・注意喚起語・危険有害性情報・注意書き・化学物質安全性データシートなどの対応する伝達要素を取り扱うシステムである（16）。

UVCB：組成が不明または不定の物質、複雑な反応生成物または生体物質。

妥当な試験法：特定の目的に対し十分な妥当性および信頼性があるとみなされ、科学的に健全な原則に基づいている試験法。ある試験法が絶対的な意味で妥当というのではなく、定義された目的との関連においてのみ妥当であることをいう（14）。

© OECD 2018

補遺 II

習熟度評価用の物質

本試験法ガイドライン 442E の付属書に従って試験法を日常的に用いるのに先立ち、実施施設は、表 1 で推奨される 10 物質について、U-SENS™により期待される予測結果を正確に入手し、習熟度確認 10 物質中 8 物質以上について、それぞれの基準範囲内に含まれる CV70 値、EC150 値を確認することにより技術的習熟度を立証すること。習熟度評価用の物質は、皮膚感作性の有害性について得られる反応の範囲を示すため選択された。それ以外の選択基準は、その物質が市販品であること、高品質の *in vivo* 参照データが入手可能であること、および U-SENS™により得られた高品質の *in vitro* データが入手可能であることに基づく。また、公表されている参照データが U-SENS™で利用可能であることとする（1）（8）。

表 1：U-SENS™の習熟度確認の立証に推奨される物質

習熟度評価用の物質	CAS 番号	物理的状態	*In vivo* における予測 [1]	U-SENS™ 溶媒／媒体	U-SENS™ CV70（μg/mL）の基準範囲 [2]	U-SENS™ EC150（μg/mL）の基準範囲 [2]
4-フェニレンジアミン	106-50-3	固体	感作性物質（強い）	完全培地 [3]	<30	陽性（≤10）
ピクリルスルホン酸	2508-19-2	液体	感作性物質（強い）	完全培地	>50	陽性（≤50）
マレイン酸ジエチル	141-05-9	液体	感作性物質（中等度）	DMSO	10-100	陽性（≤20）
レゾルシノール	108-46-3	固体	感作性物質（中等度）	完全培地	>100	陽性（≤50）
桂皮アルコール	104-54-1	固体	感作性物質（弱い）	DMSO	>100	陽性（10～100）
4-アリルアニソール	140-67-0	液体	感作性物質（弱い）	DMSO	>100	陽性（<200）
サッカリン	81-07-2	固体	非感作性物質	DMSO	>200	陰性（>200）
グリセロール	56-81-5	液体	非感作性物質	完全培地	>200	陰性（>200）
乳酸	50-21-5	液体	非感作性物質	完全培地	>200	陰性（>200）
サリチル酸	69-72-7	固体	非感作性物質	DMSO	>200	陰性（>200）

略語：CAS 番号 = CAS 登録番号

1 *In vivo* における有害性（および強度）の予測結果は、LLNA データ（1）（8）に基づく。*In vivo* における強度は、ECETOC（17）により提唱された基準を用いている。

2 既存の測定値（1）（8）に基づく。

3 完全培地：10%ウシ胎児血清、2 mM L-グルタミン、100 単位/mL ペニシリンおよび 100 μg/mL ストレプトマイシンを添加した RPMI-1640 培地で培養する（8）。

© OECD 2018

付属書 III：*In vitro* 皮膚感作性：IL-8 Luc アッセイ

最初に考慮すべき事項および限界

1. 細胞表面マーカーの発現を解析するアッセイとは異なり、IL-8 Luc アッセイは、樹状細胞（DC）が活性化すると生じるサイトカインである IL-8 発現の変化を定量する。THP-1 由来 IL-8 レポーター細胞株（ヒト急性単球性白血病細胞株である THP-1 から樹立した THP-G8）を感作性物質に曝露させ、IL-8 発現を測定する（1）。ここで、ルシフェラーゼの発現を用いて、皮膚感作性物質か非感作性物質かを識別する。

2. IL-8 Luc 法は、日本動物実験代替法評価センター（JaCVAM）、**経済産業省**（METI）および**日本動物実験代替法学会（JSAAE）**が実施したバリデーション試験で評価されたのち（2）、JaCVAM および厚生労働省（MHLW）の主導の下に、**代替試験法国際協力**（ICATM）の支援を得て、独立のピアレビューを受けた（3）。入手可能な証拠と規制当局およびステークホルダーからの情報をすべて考慮し、IL-8 Luc アッセイは、有害性の分類および表示を目的に、感作性物質と非感作性物質を識別するための IATA の一環として有用であると考えられる。IL-8 Luc アッセイデータの使用と他の情報との併用に関する例が、文献（4）（5）（6）に報告されている。

3. IL-8 Luc アッセイは、細胞培養とルシフェラーゼ測定の経験がある実験室への技術移管が可能であることが確認されている。実験室内および実験室間再現性はそれぞれ、87.7%および 87.5%であった（2）。バリデーション試験（2）および発表された他の研究（1）（6）から得られたデータによると、LLNA の結果と比較した場合、IL-8 Luc アッセイは、化合物 143 種中 118 種を陽性または陰性、25 種を確定的でないと判定し、非感作性物質（UN GHS カテゴリーなし）から皮膚感作性物質（UN GHS カテゴリー1）を識別する正確度は 86%（101/118）、感度 96%（92/96）および特異度 41%（9/22）であった。以下に記載（段落 5）されている適用領域に収まらない物質を除外する際に、IL-8 Luc アッセイは化合物 136 種中 113 種を陽性または陰性、23 種を確定的でないと判定し、IL-8 Luc アッセイの正確度は 89%（101/113）、感度 96%（92/96）および特異度 53%（9/17）であった。Urbisch et al.（7）のヒトデータによれば、IL-8 Luc アッセイは化学物質 90 種中 76 種を陽性または陰性、14 種を確定的でないと判定し、正確度は 80%（61/76）、感度 93%（54/58）および特異度 39%（7/18）であった。適用領域に収まらない物質を除外する際に、IL-8 Luc アッセイは化合物 84 種中 71 種を陽性または陰性、13 種を確定的でないと判定し、正確度は 86%（61/71）、感度 93%（54/58）および特異度 54%（7/13）であった。IL-8 Luc アッセイでの偽陰性の予測は、皮膚感作性が高い化学物質（UN GHS サブカテゴリー1A）よりも、皮膚感作性が低い／中等度の化学物質（UN GHS サブカテゴリー1B）に認める可能性が高い（6）。総合すると、上記情報は、IL-8 Luc アッセイが皮膚感作性を識別するのに有用であることを示している。IL-8 Luc アッセイは、IATA に基づく他の情報を併用し、「はじめに」の段落 7 および 8 の条項に従って検討されるべきであることから、IL-8 Luc アッセイを単独の試験法として算出した正確度の値は指標にすぎない。さらに、動物を用いない皮膚感作性試験法を評価する場合、LLNA 試験もそのほかの動物試験も、ヒトにおける皮膚感作性を完全に反映しているとはいえないことに留意すべきである。

4. 現在入手可能なデータによると、IL-8 Luc アッセイは、さまざまな有機官能基、反応メカニズム、皮膚感作性の強度（*in vivo* 試験で判定される）、物理化学的特性にまたがる被験物質に適用可能であることが示された（2）（6）。

© OECD 2018

5. IL-8 Luc アッセイは溶媒として X-VIVO™ 15 を使用するが、この組合せで、EPI Suite™ を用いて計算した場合に、Log $K_{o/w}$>3.5 である化合物や、水溶性がおよそ 100 µg/ mL である化合物を正しく評価したほか、水溶性が低い感作性物質を検出する性能が、ジメチルスルホキシド（DMSO）を溶媒として用いた IL-8 Luc アッセイより優れている（2）。しかし、20 mg/ml で溶けない被験物質の陰性結果は、X- VIVO™ 15 に不溶性であることから、偽陰性を生じる可能性がある。このため、このような化合物の陰性結果を判断に用いてはならない。バリデーション試験で、無水物の偽陰性率が高かった。さらに、細胞株（8）の代謝能が低いことや実験条件から、プロハプテン（代謝活性化を要する物質）およびプレハプテン（空気酸化により活性化される物質）が、IL-8 Luc アッセイ陰性結果を示す場合がある。ただし、プレ／プロハプテンと考えられる場合、陰性結果を慎重に解釈する必要があるものの、IL-8 Luc アッセイは、IL-8 Luc アッセイデータセットにあるプレハプテン 11 種中 11 種、プロハプテン 6 種中 6 種、プレ／プロハプテン 8 種中 6 種を正しく判断した（2）。プレハプテンおよびプロハプテンを検出するための動物を用いない 3 種類の方法（DPRA、KeratinoSens™および h-CLAT）に対する最近の包括的レビュー（9）と、IL-8 Luc アッセイに用いる THP-G8 細胞が h-CLAT に用いられる THP-1 に由来する細胞株であるという事実に基づくと、IL-8 Luc アッセイも、ほかの方法と組み合わせて、プレハプテンおよびプロハプテンを検出するための動物を用いない方法の感度を高めることができると考えられる。これまでに検討した界面活性剤は、種類（陽イオン性、陰イオン性または非イオン性など）に関わらず、（偽）陽性結果を生じている。最後に、ルシフェラーゼを阻害する化合物は、活性／測定値を混乱させ、見かけ上の発光阻害や発光増加を生じる可能性がある（10）。例えば、1 µM を超える濃度のフィトエストロゲンは、ルシフェラーゼレポーター遺伝子の過剰活性化により、別のルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイでの発光信号を阻害することが報告されている。このため、フィトエストロゲンや、ルシフェラーゼレポーター遺伝子のフィトエストロゲン様活性化を生じると考えられる化合物が高濃度に存在する場合に測定したルシフェラーゼ発現レベルは、慎重に検討する必要がある（11）。上記に基づき、界面活性剤、無水物、ルシフェラーゼ阻害物質は、IL-8 Luc アッセイの適用領域外にある。他の特定のカテゴリーに属す被験物質に IL-8 Luc アッセイを適用できない証拠がある場合、IL-8 Luc アッセイをそのようなカテゴリーに属す物質に用いるべきではない。

6. 上記の通り、IL-8 Luc アッセイは、皮膚感作性物質と非感作性物質との識別を後押しすることができる。別の情報源と併用した場合に、IL-8 Luc アッセイの成績が強度評価に貢献することができるかどうかを明らかにするには、ヒトデータに基づいた一層の研究が必要である。

7. 用語の定義を補遺 I に示す。

試験の概要

8. IL-8 Luc アッセイは、アメリカ培養コレクション（米国バージニア州マナッサス）から得たヒト単球性白血病細胞株 THP-1 を利用している。この細胞株を用いて、東北大学医学部皮膚科は、THP-1 由来 IL-8 レポーター細胞株である THP-G8 を樹立した。これは、Stable Luciferase Orange（SLO）および Stable Luciferase Red（SLR）からなるルシフェラーゼ遺伝子をそれぞれ、IL-8 プロモータおよび**グリセルアルデヒド 3-リン酸デヒドロゲナーゼ**（GAPDH）プロモータの下流に導入したものである（1）。これによって、ルシフェラーゼ遺伝子誘導の定量測定が可能になる。具体的には、感作性化合物に曝露した細胞の IL-8 および GAPDH の活性の指標として、

© OECD 2018

既知の光発生ルシフェラーゼ基質からの発光を検出するのである。

9. この二重色アッセイシステムは、IL-8 プロモータの遺伝子発現をみる橙色発光ルシフェラーゼ（SLO; λmax = 580 nm）（12）と、内部対照プロモータである GAPDH の遺伝子発現をみる赤色発色ルシフェラーゼ（SLR; λmax = 630 nm）（13）からなる。この 2 種類のルシフェラーゼがホタル D ルシフェリンと反応して異なる色を発する。光学フィルターを用いてアッセイ混合物からの発光を分割し、1 段階反応で発光を同時に測定する（14）（補遺 II）。

10. THP-G8 細胞を、被験物質で 16 時間処理したあと、IL-8 プロモータ活性を示す SLO ルシフェラーゼ活性（SLO-LA）と、GAPDH プロモータ活性を示す SLR ルシフェラーゼ活性（SLR-LA）を測定する。略語を把握しやすくするため、SLO-LA を IL8LA、SLR-LA を GAPLA と名付ける。表 1 に、IL-8 Luc アッセイにおけるルシフェラーゼ活性にまつわる用語を説明する。測定値を用いて、次のものを算出する。IL8LA／GAPLA で求まる標準化 IL8LA（nIL8LA）;被験物質で処理した THP-G8 細胞の 4 回反復測定値の算術平均と、無処置 THP-G8 細胞の nIL8LA の反復測定値の算術平均の比で求まる nIL8LA 誘導（Ind-IL8LA）;被験物質で処理した THP-G8 細胞の GAPLA の 4 回反復測定値の算術平均値と、無処置 THP-G8 細胞の GAPLA の反復測定値の算術平均値の比で求まる GAPLA 阻害（Inh- GAPLA）であり、これを細胞毒性指標として使用する。

表 1.IL-8 Luc アッセイのルシフェラーゼ活性の用語の説明

略語	定義
GAPLA	GAPDH プロモータ活性を示す SLR ルシフェラーゼ活性
IL8LA	IL-8 プロモータ活性を示す SLO ルシフェラーゼ活性
nIL8LA	IL8LA／GAPLA
Ind-IL8LA	被験物質で処理した THP-G8 細胞の nIL8LA／無処理細胞の nIL8LA
Inh-GAPLA	被験物質で処理した THP-G8 細胞の GAPLA／無処理細胞の GAPLA
CV05	Inh-GAPLA が 0.05 未満となる被験物質の最低濃度。

11. IL-8 Luc アッセイに類似の修正 *in vitro* IL-8 ルシフェラーゼ試験法のバリデーションを可能にし、適切な時機にこの試験法を含めるように本試験ガイドラインを速やかに修正するために、パフォーマンス基準（PS）（15）を利用できる。OECD による本試験ガイドライン（16）で精査、記載されている方法で、PS に準拠してバリデートされている試験法についてのみ、データ相互受け入れ（MAD）を保証する。

習熟度の立証

12. 試験法ガイドライン 442E の付属書に記載されている試験法を日常的に用いるのに先立ち、実施施設は、Good in vitro Method Practices（17）に準拠して補遺 III 収載の習熟度確認用の 9 物質を用いて技術的習熟度を立証する。さらに、本試験法使用者は、反応性のチェック（段落 15 参照）と、陽性対照および溶媒／媒体対照（段落 21～24 参照）により得られたデータの背景データベースを保持し、このようなデータを用いて、実施施設での本試験法の再現性が経時的に維持されていることを確認する。

© OECD 2018

試験手順

13. IL-8 Luc アッセイの標準操作手順（SOP）を利用できる。試験を実施する際にはこれを採用する必要がある（18）。本試験を実施する施設は、OECD テンプレートの条件に従って物質移動合意書（MTA）に署名することにより、GPC Lab.Co. Ltd.（鳥取県）から遺伝子組換え THP-G8 細胞株を入手することができる。この下の段落に、IL-8 Luc アッセイの主要構成要素と手順を記載する。

細胞の調製

14. GPC Lab.Co. Ltd.（鳥取県）の THP-G8 細胞株を、IL-8 Luc アッセイの実施に使用する（段落 8 および 13 参照）。受領したら、細胞を増殖して（2～4 代）、均質ストック細胞として凍結保存する。このストック細胞を、最大 12 代まで、または 6 週間までにわたり増殖することができる。増殖に用いる培地は、10%ウシ胎児血清（FBS）、抗生物質／抗真菌物質溶液（100 U/mL ペニシリン-G、100 µg/mL ストレプトマイシンおよび 0.25 µg/mL アムホテリシン B 含有 0.85%生理食塩水）（GIBCO Cat#15240-062 など）、0.15 µg/mL ピューロマイシン（CAS：58-58-2 など）および 300 µg/mL G418（CAS：108321-42-2 など）を含有する RPMI-1640 培地である。

15. 試験に使用する前に、反応性のチェックを行い、適正であることを判断する。反応性のチェックは、解凍後 1～2 週間または 2～4 代を経たのち、陽性対照である 4-ニトロベンジルブロミド（4-NBB）（CAS 番号：100-11-8、純度 99%以上）および陰性対照である乳酸（LA）（CAS 番号：50-21-5、純度 85%以上）を用いて実施する。4-NBB は Ind-IL8LA 陽性反応（≥1.4）を、一方、LA は Ind-IL8LA 陰性反応（<1.4）を生じるはずである。反応性チェックで適正と判断された細胞のみを試験で使用する。反応性チェックは、段落 22～24 に記載の手順に従って実施する。

16. 試験では、2～5 × 10^5 cells/mL の密度で THP-G8 細胞を播種し、48～96 時間にわたって培養フラスコで前培養する。試験当日、培養フラスコから採取した細胞を、抗生物質を含まない 10%FBS 含有 RPMI-1640 で洗浄したのち、抗生物質を含まない 10%FBS 含有 RPMI-1640 に 1 × 10^6 cells/mL で再懸濁する。次に、96 ウェル平底黒色プレート（Costar Cat#3603 など）に 50 µL（5 × 10^4 cells/well）の細胞を播種する。

被験物質および対照物質の調製

17. 被験物質および対照物質は、試験当日に調製する。IL-8 Luc アッセイには、被験物質を、市販されている無血清培地である X-VIVO™ 15（Lonza, 04-418Q）に、最終濃度 20 mg/mL になるよう溶解する。マイクロ遠心チューブに入れた被験物質 20 mg に X-VIVO™ 15 を加えて（被験物質溶解性と無関係に）1 mL とし、vortex ミキサーにかけたあと、約 20°C の周囲温度で最高 8 rpm のスピードのロータを用いて 30 分間振盪する。それでも固体の被験物質が溶解しない場合は、被験物質が完全に溶解するか安定的に分散するまで、チューブを超音波にあてる。被験物質が X-VIVO™ 15 に溶解する場合、この溶液を X-VIVO™ 15 を用いて 5 倍に希釈し、被験物質の X-VIVO™ 15 保存原液として使用する（4 mg/mL）。被験物質が X-VIVO™ 15 に溶解しない場合、混合物を再度、30 分以上振盪したのち、15,000 rpm（約 20,000*g*）で 5 分間遠心する;得られた上清を被験物質の X-VIVO™ 15 保存原液として使用する。DMSO、水や培地など、ほかの溶媒を使用する場合は、科学的根拠を提示すること。被験物質の溶解手順の詳細を、補遺 V に示す。段落 18～23 に記載の X-VIVO™ 15 溶液を、96 ウェル平底黒色プレート（段落 16 参照）を用いて調製した細胞懸濁液と 1：1（v/v）で混合する。

© OECD 2018

18. 最初の試験測定は、細胞毒性濃度を特定し、被験物質の皮膚感作性の強度を検討することを目的とする。96 ウェルプレート（Costar Cat# EW-01729-03 など）を用いて、被験物質の X-VIVO™ 15 保存原液の 2 倍希釈系列を、X-VIVO™ 15 を用いて作成する（補遺 V 参照）。次に、50 µL/ウェルの希釈溶液を、96 ウェル平底黒色プレートに入った 50 µL 細胞懸濁液に加える。これにより、X-VIVO™ 15 に可溶性の被験物質の場合、被験物質の最終濃度は 0.002～2 mg/mL となる（補遺 V）。20 mg/mL で X-VIVO™ 15 に不溶性の被験物質の場合、2～2^{10} の希釈倍率のみを検討する。ただし、被験物質の実際の最終濃度は不明のままであり、X-VIVO™ 15 保存原液中の被験物質の飽和濃度に依存する。

19. この後の試験測定では（第 2、3 および 4 回）、X-VIVO™ 15 保存原液を、最初の実験での細胞生存率 05 濃度（CV05;Inh-GAPLA が 0.05 未満になる最低濃度）の 4 倍の濃度になるよう作成する。第 1 回測定の最高濃度で、Inh-GAPLA が 0.05 を下回るほど小さくない場合、X-VIVO™ 15 保存原液を、第 1 回測定の最高濃度で作成する。第 1 回測定の保存原液濃度を CV05（X）希釈倍率で割って、CV05 の濃度を算出する（CV05（X）希釈倍率;保存原液を希釈して CV05 にするのに必要な希釈倍率）（補遺 V 参照）。20 mg/mL で X-VIVO™ 15 に不溶性の被験物質の場合、保存原液濃度 x 1/X として CV05 を求める。第 2～4 回測定の場合、次の保存原液を 4 x CV50 として調製する（補遺 V）。

20. X-VIVO™ 15 の第 2 の保存原液の希釈系列を、希釈倍率 1.5 で、96 ウェルプレートを用いて作成する。次に、50 µL/ウェルの希釈溶液を、96 ウェル平底黒色プレートに入った 50 µL 細胞懸濁液に加える。各被験物質の濃度毎に 4 ウェルを試験する。次に、サンプルをプレートシェーカーで混和し、37°C、5% CO_2 で 16 時間インキュベートしたのち、ルシフェラーゼ活性を下記の通りに測定する。

21. 溶媒対照は、50 µL/ウェルの X-VIVO™ 15 と、10%FBS 含有 RPMI-1640 を用いた 50 µL/ウェル細胞懸濁液との混合物である。

22. 推奨される陽性対照は 4-NBB である。20 mg の 4-NBB を 1.5 mL 用マイクロ遠心チューブに入れ、X-VIVO™ 15 を 1 mL になるまで加える。このマイクロ遠心チューブを vortex ミキサーにかけたあと、最高 8 rpm のスピードのロータを用いて 30 分以上振盪する。20,000 g で 5 分間遠心分離したあと、上清を X-VIVO™ 15 を用いて 4 倍に希釈し、希釈上清 500 µl を 96 ウェルプレートのウェルひとつに入れる。この希釈溶液を、X-VIVO™ 15 を用いてさらに 2 倍および 4 倍に希釈する。この溶液 50 µL を、96 ウェル平底黒色プレートのウェルに入った 50 µL の THP-G8 細胞懸濁液に加える（補遺 VI）。各濃度の陽性対照を 4 ウェルで検討する。プレートをプレートシェーカーで振盪し、CO_2 インキュベータで 16 時間インキュベートしたのち（37°C、5% CO_2）、ルシフェラーゼ活性を段落 29 の記載の通りに測定する。

23. 推奨される陰性対照は LA である。20 mg の LA を、1.5 mL 用マイクロ遠心チューブに入れ、X-VIVO™ 15 を 1 mL になるまで加える（20 mg/mL）。20 mg/mL の LA 溶液を X-VIVO™ 15 を用いて 5 倍に希釈し（4 mg/mL）; この 4 mg/mL LA 溶液 500 µL を 96 ウェルプレートのウェルひとつに入れる。この溶液を、X-VIVO™ 15 で 2 倍に希釈し、さらに 2 倍に希釈して、2 mg/mL 溶液および 1 mg/mL 溶液を作成する。この 3 種類の溶液 50 µL と溶媒対照（X-VIVO™ 15）を、96 ウェル平底黒色プレートのウェルに入った 50 µl の THP-G8 細胞懸濁液に加える。各濃度の陰性対照を 4 ウェルで検討する。プレートをプレートシェーカーで振盪し、CO_2 インキュベータで 16 時間インキュベートしたのち（37°C、5% CO_2）、ルシフェラーゼ活性を段落 29 の記載の通り

© OECD 2018

に測定する。

24. 背景データがあり、ほぼ同じ実施許容基準を満たせば、これ以外の適切な陽性対照または陰性対照を用いることができる。

25. 被験物質とのインキュベーションに先立ち、例えば、プレートをシールすることにより、揮発性の被験物質の蒸発、および被験物質によるウェル間の交差汚染を回避するよう留意する。

26. 陽性または陰性の結果を得るのに、被験物質および溶媒対照を 2～4 回測定する必要がある（表 2 参照）。各測定を別の日に実施する。このとき、新鮮な被験物質 X-VIVO™ 15 保存原液と、独立に採取した細胞を用いる。細胞は同じ継代数由来でもよい。

ルシフェラーゼ活性の測定

27. 光学フィルター付き 96 ウェルマイクロプレート用ルミノメータを用いて、発光を測定する。このようなものに、Phelios （ATTO、東京）、Tristan 941（Berthold、ドイツ、バート・ヴィルトバート）や ARVO series（PerkinElmer、米国マサチューセッツ州ウォルサム）がある。再現性を確保するため、ルミノメータは実験毎に校正する必要がある（19）。遺伝子組換えによる橙色および赤色の発光ルシフェラーゼを校正に使用する。

28. 事前に温めた Tripluc®ルシフェラーゼアッセイ試薬（Tripluc）100 µL を、被験物質処理ありまたは処理なしで処理した細胞懸濁液が入ったそれぞれのウェルに入れる。プレートを約 20°C の周囲温度で 10 分間振盪する。プレートをルミノメータに置いて、ルシフェラーゼ活性を測定する。生物発光を、光学フィルターなし（F0）およびあり（F1）で、それぞれ 3 秒間測定する。使用するルミノメータのモデルによって別の設定を用いる場合には、その正当性を示す必要がある。

29. 各濃度のパラメータを、測定値から求める。これは具体的には、IL8LA、GAPLA、nIL8LA、Ind-IL8LA、Inh-GAPLA、IL8LA の平均±SD、GAPLA の平均±SD、nIL8LA の平均±SD、Ind-IL8LA の平均±SD、Inh-GAPLA の平均±SD、Ind-IL8LA の 95%信頼区間である。この段落に使用したパラメータの定義を、補遺 I および IV に記載する。

30. 測定に先立って、マルチカラーレポーターアッセイにおける色識別は一般に、シャープカット（ロングパスまたはショートパス）フィルターまたはバンドパスフィルターなどの光学フィルターを備えた検出器（ルミノメータおよびプレートリーダ）で行う。各生物発光シグナルカラー用フィルターの透過係数を、補遺 II に基づいて試験前に校正する。

© OECD 2018

データおよび報告

データの評価

31. 陽性／陰性の判断基準は、各測定で次を認めることとする：

- 被験物質の Ind-IL8LA ≥ 1.4 で、Ind-IL8LA の 95%信頼区間の下限が 1.0 以上である場合に、IL-8 Luc アッセイ結果を陽性と判定する
- 被験物質の Ind-IL8LA < 1.4 および／または Ind-IL8LA の 95%信頼区間の下限が 1.0 未満である場合に、IL-8 Luc アッセイ結果を陰性と判定する

予測モデル

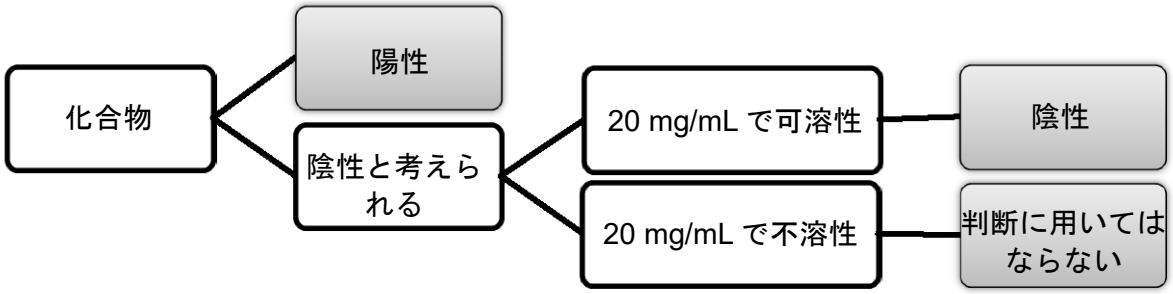
32. 第 1 回、第 2 回、第 3 回または第 4 回の測定のうち、陽性結果を 2 回認めた被験物質を陽性と判断し、第 1 回、第 2 回、第 3 回または第 4 回の測定のうち、陰性結果を 3 回認めた被験物質を陰性と考えられると判断する（表 2）。陰性と考えられる化合物のうち、X-VOVO™ 15 に 20 mg/ml で溶解するものを陰性と判定し、X-VOVO™ 15 に 20 mg/ml で溶解しない化合物の結果を判断に用いてはならない（図 1）。

表 2. 陽性および陰性と考える基準

1 回目の測定	**2 回目の測定**	**3 回目の測定**	**4 回目の測定**	**最終結果**
陽性	陽性	-	-	陽性
	陰性	陽性	-	陽性
		陰性	陽性	陽性
			陰性	陰性と考えられる
陰性	陽性	陽性	-	陽性
		陰性	陽性	陽性
			陰性	陰性と考えられる
	陰性	陽性	陽性	陽性
			陰性	陰性と考えられる
		陰性	-	陰性と考えられる

© OECD 2018

図 1.最終判断のための予測モデル



許容基準

33. IL-8 Luc アッセイを用いる場合、次の許容基準を満たすこと：

- 各測定で、陽性対照である 4-NBB のひとつ以上の濃度で Ind-IL8LA が 5.0 を上回る必要がある。
- 各測定で、陰性対照である乳酸のいずれかの濃度で Ind-IL8LA が 1.4 を下回る必要がある。
- 細胞と Triplucが入っているが被験物質が入っていない対照ウェルの GAPLA が、試験培地のみ（50 µL/ウェルの 10%FBS 含有 RPMI-1640 および 50 µL/ウェルの X-VIVO™ 15）が入ったウェルの 5 倍を下回る場合、このプレートのデータを用いてはならない。
- どの濃度の被験物質または対照物質の Inh-GAPLA も 0.05 を下回る場合、このプレートのデータを用いてはならない。このような場合、第 1 回試験を再度実施して、再試験の最高最終濃度が前の試験の最低最終濃度になるようにする。

試験報告書

34. 試験報告書には以下の情報を含む：

被験物質

- 単一成分物質：
  - 化学的識別情報、例えば IUPAC または CAS 名、CAS 番号、SMILES または InChI コード、構造式および／またはそれ以外の識別に有用な情報;
  - 外観、水への溶解度、分子量および入手可能な範囲のその他の関連する物理化学的性質;
  - 必要に応じ、また実質的に実行可能な場合の純度、不純物の化学的同定など;
  - 該当する場合、試験前の処理（例えば、加温、粉砕）；

© OECD 2018

- X-VIVO™ 15 への溶解度。X-VIVO™ 15 に不溶性の化合物の場合、遠心分離によって沈殿物ないし浮遊物を認めるかどうか;
- 試験濃度;
- 入手可能な範囲の保存条件および安定性;
- X-VIVO™ 15 を使用していない場合、各被験物質に対する溶媒／媒体選択の妥当性。

- 多成分物質、UVCB 物質および混合物：

- 入手可能な範囲の成分の化学的同定（上記参照）、純度、含有量および関連のある物理化学的性質（上記参照）などによるできる限りの成分の特性;
- 外観、水への溶解度および入手可能な範囲のその他の関連する物理化学的性質;
- 既知組成の混合物／ポリマーの場合、分子量もしくは見かけの分子量、または試験実施に関連するそれ以外の情報;
- 該当する場合、試験前の処理（例えば、加温、粉砕）;
- X-VIVO™ 15 への溶解度。X-VIVO™ 15 に不溶性の化合物の場合、遠心分離によって沈殿物ないし浮遊物を認めるかどうか;
- 試験濃度;
- 入手可能な範囲の保存条件および安定性。
- X-VIVO™ 15 を使用していない場合、各被験物質に対する溶媒／媒体選択の妥当性。

対照物質

- 陽性対照：

- 化学的識別情報、例えば IUPAC または CAS 名、CAS 番号、SMILES または InChI コード、構造式および／またはそれ以外の識別に有用な情報;
- 外観、水への溶解度、分子量および入手可能な範囲で該当する場合、その他の関連する物理化学的性質;
- 必要に応じ、また実質的に実行可能な場合の純度、不純物の化学的同定など;
- 該当する場合、試験前の処理（例えば、加温、粉砕）;
- 試験濃度;
- 入手可能な範囲の保存条件および安定性;
- 該当する場合、適切な許容基準であることを示す陽性対照結果の背景データ。

- 陰性対照：

- 化学的識別情報、例えば IUPAC または CAS 名、CAS 番号および／またはそれ以外の

© OECD 2018

識別に有用な情報;

- 必要に応じ、また実質的に実行可能な場合の純度、不純物の化学的同定など;
- 本試験法ガイドラインに記載以外の別の陰性対照を用いる場合、外観、分子量、および入手可能な範囲のその他の関連する物理化学的性質;
- 入手可能な範囲の保存条件および安定性;
- 各被験物質についての溶媒選択の妥当性。

試験法の条件

- 試験依頼者名、試験施設名、試験責任者名および住所;
- 試験法の説明;
- 細胞株、その保存条件および供給元（細胞株を入手した施設など）;
- FBC のロット番号および入手先、供給業者名称、96 ウェル平底黒色プレートのロット番号、Tripluc 試薬のロット番号;
- 継代数および試験に用いた細胞密度;
- 試験前の播種に用いた細胞計数法と、均一な細胞数を確保するための措置;
- 使用したルミノメータ（モデル）に関する機器設定、使用したルシフェラーゼ基質、補遺 II に記載されている対照試験に基づく適切な発光測定法の実証;
- 本試験法実施における実施施設の習熟度を示し（例えば、習熟度評価用物質の検討により）、経時的な再現性を立証するのに用いた手順。

試験手順

- 反復数および測定回数;
- 被験物質濃度、適用手順および曝露時間（推奨と異なる場合）;
- 評価および測定基準の記述;
- 試験許容基準の記述;
- 試験手順の修正があればその記述。

結果

© OECD 2018

- IL8LA および GAPLA の測定値;
- nIL8LA、Ind-IL8LA および Inh-GAPLA の算出値;
- Ind-IL8LA の 95%信頼区間;
- ルシフェラーゼ活性誘導および細胞生存率の用量反応曲線のグラフ;
- 該当する場合、それ以外に関連する知見があればその記述。

結果の考察

- IL-8 Luc アッセイを用いて得られた結果の考察;
- 他の関連情報が入手可能な場合、IATA の範囲内における試験結果の考察。

結論

© OECD 2018

文献

1. Takahashi T, Kimura Y, Saito R, Nakajima Y, Ohmiya Y, Yamasaki K, and Aiba S. 2011. An in vitro test to screen skin sensitizers using a stable THP-1-derived IL-8 reporter cell line, THP-G8. Toxicol Sci 124:359-69.

2. OECD (2017), Validation report for the international validation study on the IL-8 Luc assay as a test evaluating the skin sensitizing potential of chemicals conducted by the IL-8 Luc Assay. Series on Testing and Assessment No. 267, ENV/JM/MONO(2017)19. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm].

3. OECD (2017), Report of the Peer Review Panel for the IL-8 Luciferase (IL-8 Luc) Assay for in vitro skin sensitisation. Series on Testing and Assessment No. 258, ENV/JM/MONO(2017)20. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm].

2. OECD (2016), Guidance Document On The Reporting Of Defined Approaches And Individual Information Sources To Be Used Within Integrated Approaches To Testing And Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, Series on Testing & Assessment No. 256, ENV/JM/MONO(2016)29. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm].

3. van der Veen JW, Rorije E, Emter R, Natsch A, van Loveren H, and Ezendam J. 2014. Evaluating the performance of integrated approaches for hazard identification of skin sensitizing chemicals. Regul Toxicol Pharmacol 69:371-9.

4. Kimura Y, Fujimura C, Ito Y, Takahashi T, Nakajima Y, Ohmiya Y, and Aiba S. 2015. Optimization of the IL-8 Luc assay as an in vitro test for skin sensitization. Toxicol In Vitro 29:1816-30.

5. Urbisch D, Mehling A, Guth K, Ramirez T, Honarvar N, Kolle S, Landsiedel R, Jaworska J, Kern PS, Gerberick F, et al. 2015. Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. Regul Toxicol Pharmacol 71:337-51.

6. Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y, Nishiyama N, and Itagaki H. 2010. A comparative evaluation of in vitro skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). Alternatives to laboratory animals : ATLA 38:275-84.

7. Patlewicz G, Casati S, Basketter DA, Asturiol D, Roberts DW, Lepoittevin J-P, Worth A and Aschberger K (2016) Can currently available non-animal methods detect pre and pro haptens relevant for skin sensitisation? Regul Toxicol Pharmacol, online.

8. Thorne N, Inglese J, and Auld DS. 2010. Illuminating insights into firefly luciferase and other bioluminescent reporters used in chemical biology. Chem Biol 17:646-57.

9. OECD (2016), *Test No. 455: Performance-Based Test Guideline for Stably Transfected Transactivation In Vitro Assays to Detect Estrogen Receptor Agonists and Antagonists*, OECD Publishing, Paris. http://dx.doi.org/10.1787/9789264265295-en.

© OECD 2018

10. Viviani V, Uchida A, Suenaga N, Ryufuku M, and Ohmiya Y. 2001. Thr226 is a key residue for bioluminescence spectra determination in beetle luciferases. Biochem Biophys Res Commun 280:1286-91.

11. Viviani VR, Bechara EJ, and Ohmiya Y. 1999. Cloning, sequence analysis, and expression of active Phrixothrix railroad-worms luciferases: relationship between bioluminescence spectra and primary structures. Biochemistry 38:8271-9.

12. Nakajima Y, Kimura T, Sugata K, Enomoto T, Asakawa A, Kubota H, Ikeda M, and Ohmiya Y. 2005. Multicolor luciferase assay system: one-step monitoring of multiple gene expressions with a single substrate. Biotechniques 38:891-4.

13. OECD (2017), To be published - Performance Standards for the assessment of proposed similar or modified *in vitro* skin sensitisation IL-8 luc test methods. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment. OECD, Paris, France.

14. OECD (2005), Guidance Document the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Environment, Health and Safety publications, OECD Series on Testing and Assessment No.34. OECD, Paris, France.

15. OECD (2017), Draft Guidance document: Good *In Vitro* Method Practices (GIVIMP) for the Development and Implementation of *In Vitro* Methods for Regulatory Use in Human Safety Assessment. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECD%20Draft%20GIVIMP_v05%20-%20clean.pdf].

16. JaCVAM (2016), IL-8 Luc assay protocol, Available at. http://www.jacvam.jp/en_effort/effort02.html.

17. Niwa K, Ichino Y, Kumata S, Nakajima Y, Hiraishi Y, Kato D, Viviani VR, and Ohmiya Y. 2010. Quantum yields and kinetics of the firefly bioluminescence reaction of beetle luciferases. Photochem Photobiol 86:1046-9.

18. OECD (2012), The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins, Part 1: Scientific Evidence. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 168. OECD, Paris, France.

19. United Nations (2015), Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Sixth revised edition. New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Available at: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

© OECD 2018

補遺 I

定義

正確度：試験法による結果が、一般的に認められた参照値にどの程度一致するかを示す近似性の指標。試験法の性能の尺度であり、妥当性の一側面である。この用語は、多くの場合、試験法の正確な結果の割合を意味する一致性と同義的に用いられる（16）。

AOP（有害性発現経路）：分子レベルの初期事象から検討対象の *in vivo* 転帰まで、標的化学物質または一群の類似化学物質の化学構造から生じる一連の事象（20）。

CV05：細胞生存率 05。Inh-GAPLA が 0.05 未満となる被験物質の最低濃度。

FInSLO-LA：IL-8 Luc アッセイに関するバリデーション報告およびこれまでの発表に用いられている Ind-IL8LA を示す略語。定義については Ind-IL8LA を参照のこと。

GAPLA：GAPDH プロモータによって制御される Stable Luciferase Red（SLR）（λmax = 630 nm）のルシフェラーゼ活性で、細胞生存率および生細胞数を示す。

有害性：生物、生物系、または（その下位に属す）生物集団がある物質に曝露された場合、悪影響を引き起こす可能性がある物質固有の性質または状態のこと。

IATA（試験および評価に関する統合的アプローチ）：ある化学物質または一群の化学物質の危険有害性の同定（可能性）、危険有害性の特徴付け（効力）および／または安全性評価（可能性／効力および曝露）に用いられる体系的アプローチ。本アプローチでは、関連性があるデータをすべて戦略的に統合し重み付けを行うことにより、危険有害性の可能性および／またはリスクおよび／または、さらに的を絞った最小限となる試験の必要性について、規制上の意思決定情報を与える。

II- SLR-LA：IL-8 Luc アッセイに関するバリデーション報告およびこれまでの発表に用いられている Inh-GAPLA を示す略語。定義については Inh-GAPLA を参照のこと。

IL-8（インターロイキン-8）：内皮細胞、線維芽細胞、角化細胞、マクロファージおよび単球が産生するサイトカインのひとつで、好中球および T リンパ球に走化性を生じる。

IL8LA：IL-8 プロモータによって制御される Stable Luciferase Orange（SLO）（λmax = 580 nm）のルシフェラーゼ活性。

Ind-IL8LA：IL8LA の誘導倍率。化合物で処理した THP-G8 細胞の nIL8LA を、無刺激 THP-G8 細胞の nIL8LA で割ったものであり、化合物による IL-8 プロモータ活性誘導を表す。

Inh-GAPLA：GAPLA の阻害。化合物で処理した THP-G8 細胞の GAPLA を、無刺激 THP-G8 細胞の GAPLA で割ったものであり、化合物による細胞毒性を表す。

© OECD 2018

最小誘導閾値（MIT）：化合物が陽性基準を満たす最低濃度

混合物：互いに反応しない 2 つ以上の物質からなる混合物または溶液。

単一成分物質：定量的組成に、1 主要成分が 80%（w/w）以上存在することにより定義される物質。

多成分物質：その定量的組成に、2 つ以上の主要成分が濃度 10%（w/w）以上と 80%（w/w）未満で存在することにより定義される物質。多成分物質は製造過程の結果得られる。混合物と多成分物質との違いは、混合物の場合、2 つ以上の物質が化学反応を起こさず混合することにより得られるのに対し、多成分物質は化学反応の結果得られることにある。

nIL8LA：IL-8 プロモータ活性（IL8LA）を反映する SLO ルシフェラーゼ活性を、GAPDH プロモータ活性（GALPA）を反映する SLR ルシフェラーゼ活性で標準化したもの。細胞生存率や細胞数を考慮したあとの IL-8 プロモータ活性を表す。

nSLO-LA：IL-8 Luc アッセイに関するバリデーション報告およびこれまでの発表に用いられている nIL8LA を示す略語。定義については nIL8LA を参照のこと。

陽性対照：試験系のすべての構成成分を含み、陽性反応を誘導することが知られている物質で処理を反復する対照。陽性対照反応の経時的変化を評価できるように、陽性反応の大きさが過剰であってはならない。

プレハプテン：非生物的な変換を通じて感作性物質となる化学物質。

プロハプテン：皮膚感作性を有するために、酵素による活性化を要する化学物質。

妥当性：試験と検討対象の影響との関係と、試験が特定の目的にとって意義や有用性があるかを示す用語。試験が試験対象となる生物学的影響を正確に測定または予測できる程度を示す。妥当性は、試験法の正確性（一致度）を含む（16）。

信頼性：同じプロトコルを用いて試験法を実施したときに得られる経時的な実験室内および実験室間再現性の程度を表す尺度。実験室内再現性および実験室間再現性ならびに実験室内の繰り返し精度の算出により評価される（16）。

測定：溶媒／媒体対照および陽性対照で同時に検討される 1 つ以上の被験物質から成る一組の試験。

感度：すべての陽性化学物質や活性化学物質のうち、試験によって正確に分類されるものの割合。分類的な結果をもたらす試験法の正確性を示す尺度であり、試験法の妥当性を評価する上で考慮することが重要である（16）。

SLO-LA：IL-8 Luc アッセイに関するバリデーション報告およびこれまでの発表に用いられている IL8LA を示す略語。定義については IL8LA を参照のこと。

SLR-LA：IL-8 Luc アッセイに関するバリデーション報告およびこれまでの発表に用いられてい

© OECD 2018

る GAPLA を示す略語。定義については GAPLA を参照のこと。

溶媒／媒体対照：用いる溶媒／媒体を含んだ試験系のすべての構成成分を含むが、被験物質は除いてある未処理サンプルのこと。同じ溶媒／媒体に溶解、または安定的に分散した被験物質で処理したサンプルについて、ベースラインの反応を確認するために用いられる。

培地対照を同時に用いた試験の場合、本サンプルは、溶媒／媒体と試験系との相互作用の有無も示す。

特異度：すべての陰性や不活性な化学物質のうち、試験によって正確に分類されるものの割合。分類的な結果をもたらす試験法の正確性を示す尺度であり、試験法の妥当性を評価する上で考慮することが重要である（16）。

物質：自然の状態または製造過程で得られる化学元素とその化合物のことをいい、その製品の安定性を保つために必要な添加物や、その使用工程から派生する不純物は含まれるが、その物質の安定性に影響を及ぼすことも、その組成を変化させることもなく分離する可能性のある溶媒は除く。

界面活性剤：表面活性剤とも呼ばれる物質で、洗剤などを含む。液体の表面張力を低下させることにより、泡を生じたり、固体に浸透することができる。浸潤剤とも呼ばれる。（TG437）

被験物質：「被験物質」という用語は、試験対象であることをいう場合に用いる。

THP-G8：IL-8 Luc アッセイに用いられる IL-8 レポーター細胞株。IL-8 プロモータおよび GAPDH プロモータの制御を受けるように SLO および SLR のルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだヒトマクロファージ様細胞株 THP-1。

国連勧告「化学品の分類および表示に関する世界調和システム」（UN GHS）：人々（雇用主、労働者、輸送担当者、消費者、緊急時対応者など）および環境を守るために、危険有害作用に関する情報を伝達することを目的として、物理学上、健康上および環境上の有害性の種類およびレベルの基準に従って化学品（物質および混合物）の分類法を提案するとともに、絵表示・注意喚起語・危険有害性情報・注意書き・化学物質安全性データシートなどの対応する伝達要素を取り扱うシステムである（21）。

UVCB：組成が不明または不定の物質、複雑な反応生成物または生体物質。

妥当な試験法：特定の目的に対し十分な妥当性および信頼性があるとみなされ、科学的に健全な原則に基づいている試験法。ある試験法が絶対的な意味で妥当というのではなく、定義された目的との関連においてのみ妥当であることをいう。

© OECD 2018

補遺 II

ルシフェラーゼ活性測定の原理と SLO および SLR 用光学フィルターの透過係数の決定

マルチレポーターアッセイシステムである Tripluc を、光学フィルターを装着しうるマルチカラー検出システムを備えたマイクロプレートタイプのルミノメータ（例えば、Phelios AB-2350（ATTO）、ARVO（PerkinElmer）、Tristar LB941（Berthold））で使用することができる。測定に用いる光学フィルターは、600～620 nm のロングパスないしショートパスフィルターまたは 600～700 nm のバンドパスフィルターである。

(1) 1 枚の光学フィルターを用いた 2 色のルシフェラーゼ測定。
これは、Phelios AB-2350（ATTO）を使用した場合である。このルミノメータは、SLO（λmax = 580 nm）と SLR（λmax = 630 nm）との発光を分離するため、600 nm ロングパスフィルター（R60 HOYA Co.、600 nm LP、フィルター1）を備えている。

まず、600 nm LP の透過係数を求めるため、精製 SLO および SLR ルシフェラーゼ酵素を用いて、i)フィルターなしでの SLO および SLR の生物発光強度（F0）と、ii)600 nm LP （フィルター1）を透過した SLO および SLR の生物発光強度とを測定し、iii)以下に挙げる SLO および SLR の 600 nm LP 透過係数を算出する。

透過係数		略語	定義
SLO	フィルター1 透過係数	κO_{R60}	SLO のフィルター透過係数
SLR	フィルター1 透過係数	κR_{R60}	SLR のフィルター透過係数

試験サンプルの SLO および SLR の強度をそれぞれ O および R と定義した場合、i)フィルターなしでの光の強度（全光）F0、ii) 600 nm LP（フィルター1）を透過した光の強度 F1 を次の通りに表すことができる。

$$F0 = O + R$$

$$F1 = \kappa O_{R60} \times O + \kappa R_{R60} \times R$$

ここに挙げた式を、次のように書き換えることができる：

$$\begin{pmatrix} F0 \\ F1 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 1 \\ \kappa O_{R60} & \kappa R_{R60} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} O \\ R \end{pmatrix}$$

ここで、算出した透過係数（κO_{R60} および κR_{R60}）、F0 および F1 を用いて、O および R の値を次の通りに算出することができる：

$$\begin{pmatrix} O \\ R \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 1 \\ \kappa O_{R60} & \kappa R_{R60} \end{pmatrix}^{-1} \begin{pmatrix} F0 \\ F1 \end{pmatrix}$$

透過係数を求めるための材料と方法

© OECD 2018

(1)　試薬
· 単一精製ルシフェラーゼ酵素：
凍結乾燥精製 SLO 酵素
凍結乾燥精製 SLR 酵素
（バリデーション操作用に、GPC Lab.Co. Ltd.、鳥取県から THP-G8 細胞株とともに入手した）
· アッセイ試薬：
Tripluc®ルシフェラーゼアッセイ試薬（TOYOBO Cat#MRA-301 など）
· 培地：ルシフェラーゼアッセイ用（30 ml、2～8°C で保管）

試薬	濃度	培地中最終濃度	必要量
RPMI-1640	-	-	27 ml
FBS	-	10 %	3 ml

(2)酵素液の調製
チューブに入った凍結乾燥精製ルシフェラーゼ酵素に、10%（w/v）グリセロールを添加した 200 µL の 10～100 mM Tris/HCl または Hepes/HCl（pH 7.5～8.0）を加えて溶解し、この酵素液を、1.5 ml ディスポーザブルチューブに 10 µL ずつ分取し、-80°C の冷凍庫に保管する。凍結酵素液は、最長 6 ヵ月まで使用可能である。使用する際には、酵素液の入ったチューブ（融解酵素液）それぞれに、1 ml のルシフェラーゼアッセイ用培地（10% FBS 含有 RPMI- 1640）を加え、失活しないように氷上に置く。

(3)生物発光測定
Tripluc®ルシフェラーゼアッセイ試薬（Tripluc）を融解し、ウォーターバスに入れるか静置により室温を保つ。測定開始 30 分前にルミノメータの電源を入れ、光電子増倍管を安定化させる。希釈酵素液 100 µL を、96 ウェル黒色プレート（平底）に移す（SLO 参照サンプル#B1、#B2、#B3 および SLR 参照サンプル#D1、#D2、#D3）。次に、この希釈酵素液を入れたプレートの各ウェルに、予め加温した Tripluc 100 µL をピペットマンを用いて加える。プレートシェーカーを用いて、このプレートを室温（約 25°C）で 10 分間振盪する。ウェルの溶液に気泡があれば、これを除去する。ルシフェラーゼ活性を測定するため、プレートをルミノメータに置く。生物発光を、光学フィルターなし（F0）およびあり（F1）で、それぞれ 3 秒間測定する。

次の通りに、光学フィルターの透過係数を算出した。

透過係数（SLO（κO_{R60}））＝（F1 の#B1 + F1 の#B2 + F1 の#B3）／（F0 の#B1 + F0 の#B2 + F0 の#B3）

透過係数（SLR（κR_{R60}））＝（F1 の#D1 + F1 の#D2 + F1 の#D3）／（F0 の#D1 + F0 の#D2 + F0 の#D3）

同じルミノメータを用いて実施した測定値すべてに、算出した透過率を用いる。

装置の品質管理

IL-8 Luc プロトコルに記載の手順を用いる（18）。

© OECD 2018

補遺 III

習熟度評価用の物質

本試験法ガイドライン 442E の付属書に従って試験法を日常的に用いるのに先立ち、実施施設は、表 1 で推奨される 9 物質について、IL-8 Luc アッセイにより期待される予測結果を入手し、（皮膚感作性の有害性に関する反応の範囲を表すように選択した）習熟度確認 9 物質中 8 物質以上について、それぞれの基準範囲内に含まれる値を確認することにより技術的習熟度を立証すること。それ以外の選択基準は、その物質が市販品であること、高品質の *in vivo* 参照データが入手可能であること、および IL-8 Luc アッセイにより得られた高品質の *in vitro* データが入手可能であることに基づく。また、公表されている参照データが IL-8 Luc アッセイで利用可能であることとする（6）（1）。

表 1：IL-8 Luc アッセイの習熟度確認の立証に推奨される物質

習熟度評価用の物質	CAS 番号	状態	20 mg/mL での X-VIVO15 溶解性	*In vivo* における予測 [1]	IL-8 Luc による予測 [2]	基準範囲（µg/mL）[3]	
						CV05[4]	IL-8 Luc MIT[5]
2,4-ジニトロクロロベンゼン	97-00-7	固体	不溶性	感作性物質（非常に強い）	陽性	2.3-3.9	0.5-2.3
ホルムアルデヒド	50-00-0	液体	可溶性	感作性物質（強い）	陽性	9-30	4-9
2-メルカプトベンゾチアゾール	149-30-4	固体	不溶性	感作性物質（中等度）	陽性	250-290	60-250
エチレンジアミン	107-15-3	液体	可溶性	感作性物質（中等度）	陽性	500-700	0.1-0.4
エチレングリコールジメチルアクリレート	97-90-5	液体	不溶性	感作性物質（弱い）	陽性	>2000	0.04-0.1
4-アリルアニソール（エストラゴール）	140-67-0	液体	不溶性	感作性物質（弱い）	陽性	>2000	0.01-0.07
ストレプトマイシン硫酸塩	3810-74-0	固体	可溶性	非感作性物質	陰性	>2000	>2000
グリセロール	56-81-5	液体	可溶性	非感作性物質	陰性	>2000	>2000
イソプロパノール	67-63-0	液体	可溶性	非感作性物質	陰性	>2000	>2000

略語：CAS 番号 = CAS 登録番号

[1] *In vivo* における強度は、ECETOC（19）により提唱された基準を用いている。

[2] 既存の測定値（1）（6）に基づく。

[3] EPI Suite™ で得た水に対する溶解度を用いて、CV05 および IL-8 Luc MIT を算出した。

[4] CV05：Inh-GAPLA が 0.05 未満となる被験物質の最低濃度。

[5] MIT：化合物が陽性基準を満たす最低濃度

© OECD 2018

補遺 IV

指標および判断基準

nIL8LA（nSLO-LA）

IL8LA（SLO-LA）および GAPLA（SLR-LA）についてそれぞれ、i 番目の濃度（i = 0～11）の j 番目の繰り返し（j = 1～4）測定を実施する。標準化した IL8LA を nIL8LA（nSLO-LA）と呼び、次の式で表される：

$nIL8LA_{ij} = IL8LA_{ij} / GAPLA_{ij}$

これが、このアッセイにおける基本の測定値である。

Ind-IL8LA（FInSLO-LA）

i 番目の濃度での繰り返しに関して、nIL8LA（nSLO-LA）平均値を、この濃度が 0 のものと比較した倍数。Ind-IL8LA がこのアッセイの最重要尺度である。この比は次の式で表される：

$$\text{Ind-IL8LA}_i = \left\{(1/4)\times\sum \text{j nIL8LA}_{ij}\right\} / \left\{(1/4)\times\sum \text{j nIL8LA}_{oj}\right\}.$$

主導試験室は、値 1.4 が被験物質の陽性結果に相当することを提案している。この値は、主導試験室の背景データの検討に基づいている。その後、データマネジメントチームがどのバリデーション試験フェーズにもこの値を使用している。主要評価項目である Ind-IL8LA は、式に示す通り、2 つの算術平均の比である。

95%信頼区間（95% CI）

上記の比の 95%信頼区間（95% CI）は、主要評価項目の精度を示すと考えられる。95% CI の下限が 1 以上であれば、i 番目の濃度の nIL8LA が、溶媒対照より有意に高いことを示している。95%CI を求めるにはいくつかの方法がある。本試験では、Fieller の定理として知られている方法を用いた。この 95%信頼区間は次の式で求まる：

$$\left[\frac{-B-\sqrt{B^2-4AC}}{2A}, \frac{-B+\sqrt{B^2-4AC}}{2A}\right],$$

ここで $A = \bar{x}_0^2 - t^2_{0.975(\nu)} \times \frac{sd_0^2}{n_0}$, $B = -2\times\bar{x}\times\bar{y}$, $C = \bar{y}_i^2 - t^2_{0.975(\nu)} \times \frac{sd_{y_i}^2}{n_{y_i}}$、$n_0 = 4$、

$\bar{x}_0 = (1/n_0)\times\sum_j nIL8LA_{0j}$, $sd_0^2 = \{1/(n_0-1)\}\times\sum_j (nIL8LA_{0j} - \bar{x}_0)^2$,

$n_{y_i} = 4$, $\bar{y}_i = (1/n_{y_i})\times\sum_j (nIL8LA_{ij})$, $sd_{y_i}^2 = \{1/(n_{y_i}-1)\}\times\sum_j (nIL8LA_{ij} - \bar{y}_i)^2$.

$t_{0.975(\nu)}$ は、自由度 ν での中央 t 分布の 97.5 パーセンタイルであり、ここで、

© OECD 2018

$$\nu = \left(\frac{sd_0^2}{n_0} + \frac{sd_{y_i}^2}{n_{y_i}} \right)^2 / \left\{ \left(\frac{sd_0^2}{n_0} \right)^2 / (n_0 - 1) + \left(\frac{sd_{y_i}^2}{n_{y_i}} \right)^2 / (n_{y_i} - 1) \right\}.$$

Inh-GAPLA（II-SLR-LA）

Inh-GAPLA は、i 番目の濃度での繰り返しに関して、GAPLA（SLR-LA）平均値を溶媒対照と比較した比率であり、次のように表される

$$\text{Inh- GAPLA}_i = \left\{ (1/4) \times \sum j \ \text{GAPLA}_{ij} \right\} / \left\{ (1/4) \times \sum j \ \text{GAPLA}_{oj} \right\}$$

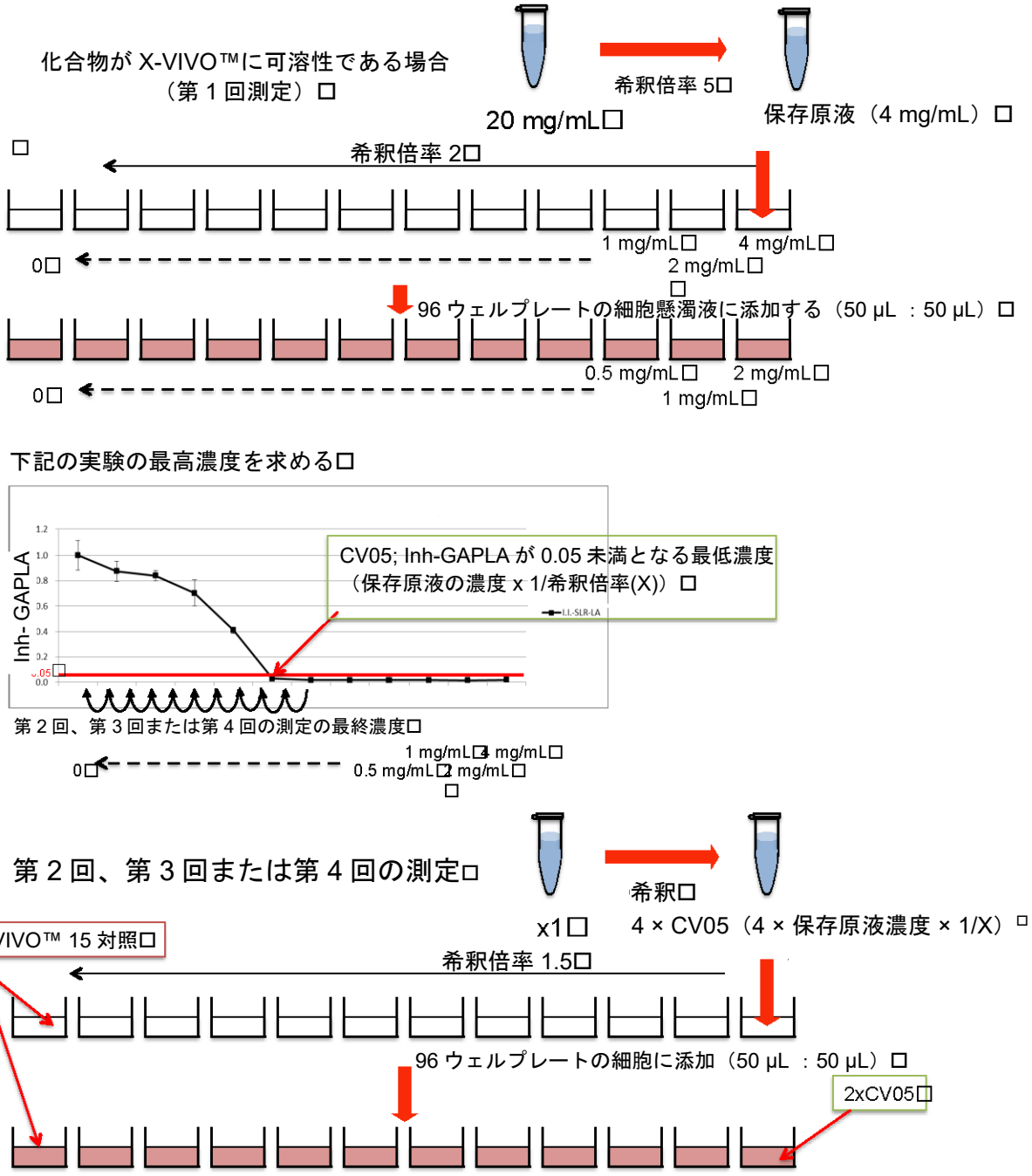
GAPLA は nIL8LA の分母であることから、極端に小さい値であると nIL8LA のばらつきが大きくなる。したがって、Inh-GAPLA が極端に小さい値（0.05 未満）である Ind-IL8LA 値は、精度が低いと考えられる。

© OECD 2018

補遺 V

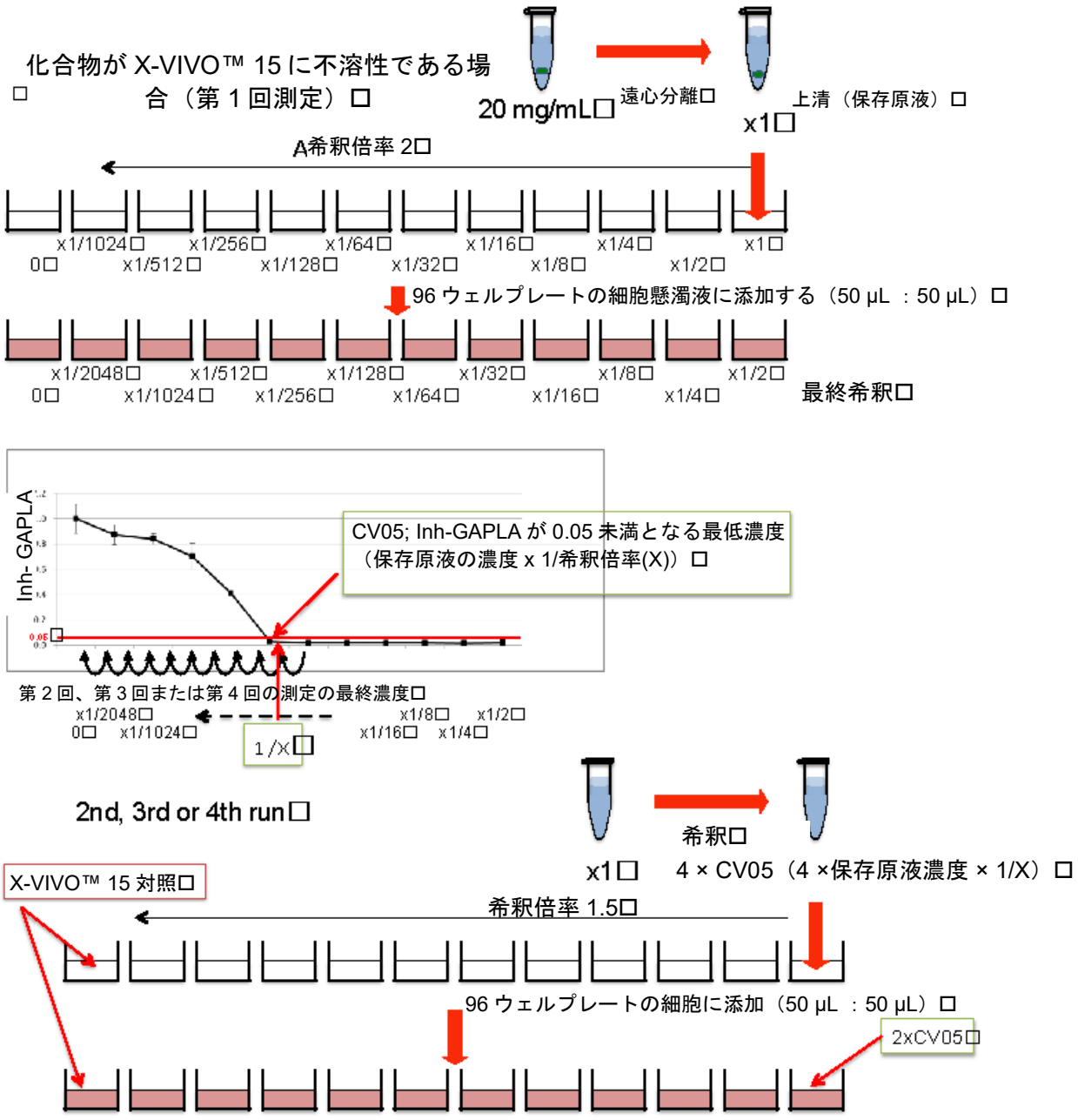
IL-8 LUC アッセイ用に化合物を溶解する方法

(a) 化合物が 20 mg/mL で X-VIVO™ 15 に溶解する場合



© OECD 2018

(b) 化合物が 20 mg/mL で X-VIVO™ 15 に不溶性である場合

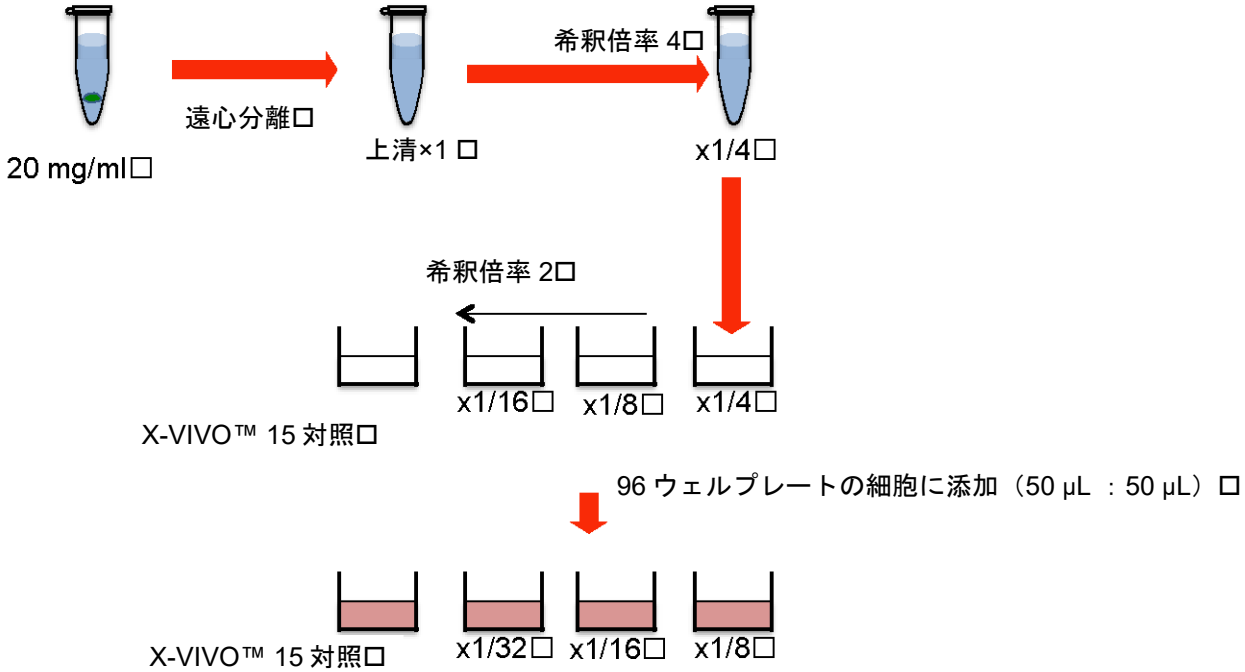


© OECD 2018

補遺 VI

IL-8 Luc アッセイの陽性対照用に 4-NBB を溶解する方法

陽性対照：4-NBB（X-VIVO™ 15 に不溶性）□



© OECD 2018